



Оригинальная статья

Аппаратный способ подготовки биоматериала для фекальной трансплантации

Шедоева Л.Р.¹ • Чашкова Е.Ю.¹ • Карноухова О.Г.² • Коган Г.Ю.²

Шедоева Людмила Руслановна – врач-колопроктолог, мл. науч. сотр. лаборатории реконструктивной хирургии научного отдела клинической хирургии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6525-3522>

✉ 664049, г. Иркутск, мкр-н Юбилейный, 100, Российская Федерация (ГБУЗ Иркутская ордена «Знак Почета» областная клиническая больница, колопроктологическое отделение).
Тел.: +7 (924) 609 12 89.
E-mail: cristal608@yandex.ru

Чашкова Елена Юрьевна – канд. мед. наук, врач-колопроктолог, вед. науч. сотр., заведующая лабораторией реконструктивной хирургии научного отдела клинической хирургии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7953-6523>

Карноухова Ольга Геннадьевна – канд. мед. наук, врач-бактериолог, доцент кафедры патофизиологии и клинической лабораторной диагностики²

Коган Галина Юрьевна – врач-бактериолог, ассистент кафедры патофизиологии и клинической лабораторной диагностики²

Актуальность. Сегодня фекальная трансплантация рассматривается как компонент лечения широкого спектра патологических состояний, включая аутоиммунные заболевания (язвенный колит, болезнь Крона, сахарный диабет 1-го типа и инсулинорезистентность, рассеянный склероз, псориаз). Качественная подготовка биоматериала – необходимая процедура, позволяющая в течение длительного времени хранить приготовленный фекальный трансплантат при ультранизких температурных режимах и использовать его по мере необходимости.

Цель – оптимизировать способ подготовки биоматериала для фекальной трансплантации и оценить его «выживаемость» в различные временные промежутки в условиях криоконсервации.

Материал и методы. Разработано и предложено устройство для подготовки донорского фекального материала для трансплантации (патент Российской Федерации № 2659417 от 02.07.2018). В смеситель устройства помещается фекальный материал донора, собранный утром в день заготовки в стерильный контейнер, растворитель, глицерол, затем содержимое автоматически гомогенизируется в закрытом контуре и пропускается через одноразовый фильтр, к которому присоединен стерильный контейнер-гемакон. Длительное хранение полученного трансплантата обеспечивает заморозка при ультранизких температурных режимах (криоконсервация при -80 °С). Изучали микробный состав полученного нативного субстрата и образцов, подвергшихся криоконсервации, в различные временные интервалы (от 7 до 365 суток).

Результаты. Предложенный оригинальный способ позволяет бесконтактно в закрытом контуре приготовить биоматериал для хранения в низкотемпературном режиме для последующей фекальной трансплантации в течение 6–12 месяцев. При анализе фекального трансплантата в различные временные промежутки не обнаружено качественных и количественных различий в микробном составе между нативным материалом донора и свежеприготовленным фильтратом. Приготовленный по оригинальной методике биоматериал сохраняется в течение 12 месяцев.

Заключение. Предложенный аппаратный способ подготовки биоматериала для фекальной трансплантации удобен в использовании и позволяет приготовить трансплантат с минимальной внешней микробной контаминацией, в отличие от общепринятого метода подготовки донорского материала путем фильтрации фекальных масс через марлевые или кофейные фильтры с ручным пособием.

Ключевые слова: трансплантация фекальной микробиоты, аппаратный способ подготовки биоматериала, выживаемость трансплантата

Для цитирования: Шедоева ЛР, Чашкова ЕЮ, Карноухова ОГ, Коган ГЮ. Аппаратный способ подготовки биоматериала для фекальной трансплантации. Альманах клинической медицины. 2020;48(6):403–11. doi: 10.18786/2072-0505-2020-48-060.

Поступила 05.10.2020; доработана 12.11.2020; принята к публикации 13.11.2020; опубликована онлайн 27.11.2020

¹ ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»; 664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России; 664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1, Российская Федерация



Трансплантацию фекальной микробиоты (ТФМ) широко изучают в комплексном лечении метаболического синдрома, заболеваний желудочно-кишечного тракта, в том числе воспалительных заболеваний кишечника, неврологических, психических, эндокринных, аутоиммунных и ряда других патологических состояний и заболеваний. По состоянию на 21.10.2020 на сайте clinicaltrials.gov зарегистрировано 348 рандомизированных клинических исследований (РКИ) по изучению ТФМ. Доказана эффективность метода в лечении тяжелого рецидивирующего псевдомембранозного колита [1–3]. В некоторых странах Европы, в Америке и Австралии метод ТФМ включен в национальные клинические руководства по лечению клостридиальной инфекции [4–7]. По данным РКИ и отдельных научных исследований, получены как положительные, так и отрицательные результаты в достижении поставленных целей, остается и ряд спорных моментов. До сих пор не определены четкие руководства по технологии подготовки трансплантата, временные точки в процессе сбора, подготовки, хранения фекального материала, отсутствуют данные о материальном и техническом оснащении, кадровом обеспечении, не решен вопрос о сроках хранения приготовленного биоматериала. Поиски «идеального донора» остаются открытым вопросом, в связи с чем ведутся широкие исследования по созданию мультидонорного материала и синтетической микробиоты.

Согласно данным литературы, подготовка фекального трансплантата осуществляется при непосредственном тактильном контакте исследователя с биологическим материалом [8, 9]. Только в одной работе китайских исследователей (В. Сui и соавт., 2015) мы нашли описание способа подготовки трансплантата, при котором фекалии донора смешивают с растворителем блендером, а в дальнейшем после автоматической фильтрации проводится 4-кратное центрифугирование полученного супернатанта для очистки микробиоты от каловых масс. Полученный супернатант использовали для процедуры ТФМ сразу или после криоконсервации. После размораживания исследователи вновь проводили процедуру очистки биоматериала от консерванта, применяя центрифугирование и 3-кратное разведение физиологическим раствором [10]. В опубликованных статьях нет конкретных данных о необходимом количестве или объеме фекального материала для подготовки суспензии к трансплантации. В некоторых исследованиях был определен минимальный вес фекалий в 25–50 г [11, 12], другие авторы использовали фекальные массы

весом до 250 г [13]. Большинство исследователей для подготовки фекальной суспензии применяли от 50 до 100 г каловых масс донора [9, 12–19]. В дальнейшем схема подготовки материала для фекальной трансплантации обычно не имеет принципиальных различий и заключается в следующем: свежие фекальные массы при помощи шпателя или бытового блендера смешиваются с разбавителем до гомогенного состояния [11–19]. Чаще всего в качестве растворителя используют стерильный физиологический раствор (0,9% раствор хлорида натрия), питьевую воду, молоко, йогурт и т.д. [8]. Однако объем используемого разбавителя тоже находится в широком диапазоне – от 150 до 500 мл [11–19] – и определяется конкретным исследователем [6]. Добавление 10% глицерола в качестве криопротектора к фекальной суспензии дает возможность хранить биоматериал в морозильной камере в течение длительного периода. Криоконсервацию проводят путем добавления криопротектора с последующей заморозкой при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [11, 12, 16, 17, 19].

К недостаткам распространенного способа подготовки биоматериала следует отнести прежде всего необходимость непосредственного, прямого тактильного, обонятельного и зрительного контакта исследователя с фекальными массами, что может спровоцировать развитие у него психоэмоциональных физиологических рефлексов (тошнота, рвота, диспепсия и т.п.). Другие важные недостатки данного метода – продолжительный временной интервал процесса гомогенизации, длительный период фильтрации биоматериала через марлевые или кофейные фильтры, что неизбежно приводит к внешней микробной контаминации готовящегося трансплантата.

Процедура подготовки фекального фильтра предполагает применение дополнительных средств защиты при работе с биоматериалом и специально выделенного помещения (согласно требованиям СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность», Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»).

Для процедуры фекальной трансплантации возможно применение нативного трансплантата (готовится непосредственно перед процедурой ТФМ) и замороженного, который может храниться определенное время при ультранизких температурных режимах. Криоконсервация приготовленной фекальной суспензии позволяет создать необходимый резерв материала и использовать его



по мере необходимости, а также транспортировать на дальние расстояния, соблюдая температурный режим.

В 2012 г. в США основан некоммерческий фонд OpenBiome [20], который оказывает помощь людям, страдающим от тяжелой формы рецидивирующей диареи, вызванной антибиотикоустойчивым штаммом *Clostridium difficile*. Фонд OpenBiome создал первый в США банк замороженных фекальных образцов для лечения пациентов методом фекальной трансплантации. Подобные банки замороженных фекальных образцов существуют в ряде стран Европы, Австралии и Китае под названием *tfmBank* [10]. Следует отметить, что только в китайском *tfmBank* используют обогащенную микробиоту, подготовленную методом автоматической очистки. Исследования, проведенные Т. Zhang и соавт. [21], выявили положительную корреляцию между массой фекалий и количеством полученной методом фильтрации обогащенной микробиоты (95% доверительный интервал 0,61–0,68, $p < 0,0001$). Авторы показали разницу в частоте побочных эффектов после проведения ТФМ в зависимости от метода приготовления биоматериала (ручной или автоматический): у пациентов с язвенным колитом – 38,7 против 12,3% ($p < 0,001$), у пациентов с болезнью Крона – 21,7 против 4,26% ($p < 0,001$) соответственно. Кроме того, отмечена достоверная разница в частоте повышения температуры тела после процедуры ТФМ – в 19,35% случаев в группе, которой вводили биоматериал, подготовленный ручным методом, против 5,15% случаев у пациентов в группе, где биоматериал был подготовлен без ручного пособия ($p < 0,001$).

Цель настоящей работы – оптимизировать способ подготовки биоматериала для фекальной трансплантации и оценить его «выживаемость» в различные временные промежутки в условиях криоконсервации.

Материал и методы

В 2017 г. сотрудниками ФГБНУ ИНЦХТ разработано устройство [22], позволяющее в течение непродолжительного промежутка времени бесконтактно в закрытом контуре подготовить фекальный трансплантат для длительного хранения (рис. 1). Устройство для подготовки донорского фекального материала к трансплантации содержит камеру смешивания, соединенную с емкостью для раствора, с насосом для подачи раствора в камеру, механизмом перемещения полученной смеси из камеры смешивания в фильтрующий элемент и блок управления, соединенный с каждым элементом устройства.

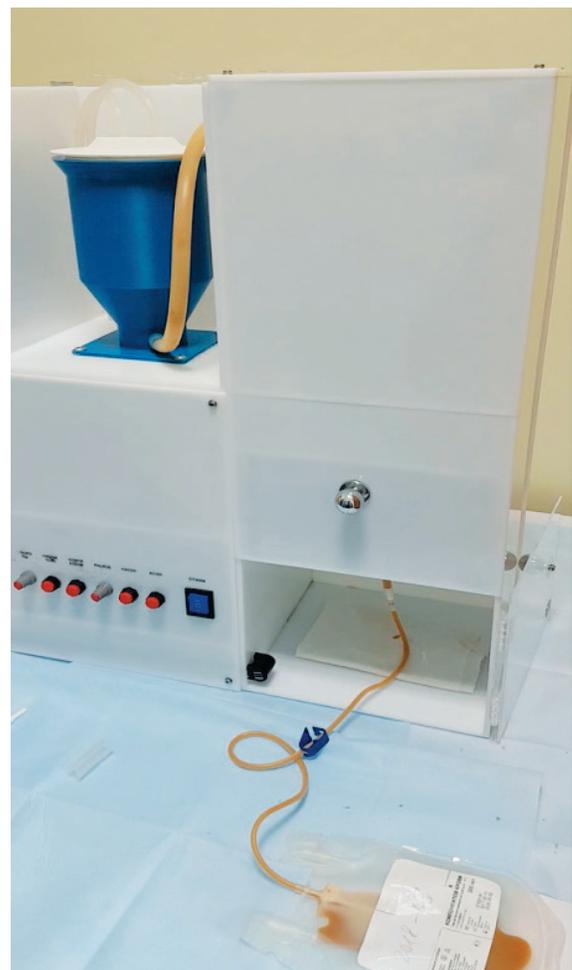


Рис. 1. Устройство для подготовки донорского фекального материала к трансплантации

Подготовка фекального материала для трансплантации выполняется следующим образом: вся порция утренней дефекации донора естественным образом собирается в стерильный пластиковый контейнер с крышкой и в течение ≤ 3 часов транспортируется в лабораторию. В исследовании приняли участие 10 здоровых волонтеров в качестве потенциальных доноров. На электронных весах взвешивается контейнер с биоматериалом, вес каловых масс рассчитывается как разница между общей массой контейнера и весом пустого контейнера. Для подготовки суспензии полученный биоматериал выкладывается в камеру смешивания, куда автоматически поступает стерильный раствор в необходимом количестве, объем которого зависит от массы нативного материала. В качестве растворителя используется 0,9% стерильный физиологический раствор. В среднем необходимо 300–350 мл растворителя для подготовки трансплантата общим



Выживаемость фекального трансплантата в условиях криоконсервации

Вид микроорганизмов	0-е сутки, свежеприготовленный нативный субстрат (n=10)	Криоконсервация				
		7-е сутки (n=10)	30-е сутки (n=10)	90-е сутки (n=10)	180-е сутки (n=10)	365-е сутки (n=10)
Бифидобактерии, Ig КОЕ/г	10,0 (10,0–10,0)	7,0 (6,0–8,0)	9,0 (6,0–10,0)	10,0 (8,0–10,0)	10,0 (10,0–10,0)	10,0 (10,0–10,0)
Лактобактерии, Ig КОЕ/г	9,0 (7,0–9,0)	9,0 (9,0–9,0)	9,0 (7,0–9,0)	7,0 (7,0–9,0)	7,0 (7,0–9,0)	7,0 (7,0–8,0)
Энтерококки, Ig КОЕ/г	7,0 (7,0–7,0)	7,0 (7,0–7,0)	7,0 (7,0–7,0)	0 (0–0)	7,0 (5,0–9,0)	4,5 (0–7,0)
Клостридии, Ig КОЕ/г	0 (0–7,0)	3,5 (0–7,0)	0 (0–7,0)	0 (0–0)	3,0 (0–7,0)	0 (0–0)
Кишечная палочка (общее количество), Ig КОЕ/г	8,6 (8,6–8,6)	8,6 (8,6–8,6)	8,6 (8,6–8,6)	4,6 (3,2–5,5)	8,6 (8,6–8,6)	6,18 (5,0–8,6)
Лактозоотрицательные кишечные палочки, % Me	15,0 (5,0–50,0)	30,0 (0,0–40,0)	57,0 (5,0–70,0)	0 (0–0)	5,0 (0–20,0)	0 (0–0)
Кишечная палочка со сниженной ферментативной активностью, Ig КОЕ/г	10,0 (10,0–10,0)	10,0 (10,0–10,0)	10,0 (10,0–10,0)	0 (0–0)	10,0 (10,0–10,0)	0 (0–0)
Кокковые формы в общей сумме микробов, % Me	10,0 (10,0–10,0)	10,0 (10,0–10,0)	10,0 (10,0–10,0)	0 (0–0)	10,0 (10,0–10,0)	10,0 (10,0–10,0)
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i> , Ig КОЕ/г	0 (0–3,0)	0 (0–3,0)	0 (0–3,0)	0 (0–3,0)	0 (0–3,0)	0 (0–0)

n – количество образцов

Результаты выживаемости отдельных микроорганизмов представлены в виде медианы с верхним и нижним квартилями – Me (Q1–Q3). Статистическая значимость различий ($p < 0,05$) отражена на графиках

объемом до 300 мл, примерно 50 мл физиологического раствора идет на заполнение «мертвого пространства» – просвета трубок для подачи раствора. Перед центрифугированием в контейнер с биоматериалом добавляется 3 мл 10% раствора стерильного глицерола в качестве криопротектора. Смешивание компонентов до гомогенного состояния проводится на средних оборотах в течение 60 с. Затем компрессор пропускает полученную суспензию через фильтр одноразового использования, представляющий собой синтетическую сетку галунного плетения (фильтровая сетка) П64 (64 проволоки-основы на 1 дм сетки) для фильтрации частиц 0,1–0,25 мм и выше в цилиндр, к которому присоединяется стерильный гемакон объемом 300 мл, выдерживающий криоконсервацию -80°C . Пассивное заполнение гемакона происходит в течение 20–30 минут. Таким образом, процесс подготовки от момента сбора биоматериала и до получения конечного готового продукта занимает не более 60 минут. Готовый биоматериал для трансплантации подвергается криозаморозке и дальнейшему хранению при температуре -80°C в течение 6–12 месяцев в морозильной камере.

«Выживаемость» подготовленного аппаратным методом фекального материала (то есть сохранение видового и количественного состава микроорганизмов по сравнению с исходным материалом) оценена на основании анализа результатов его бактериологического исследования в динамике: в день сдачи материала (0-й день – нативный фильтрат, не подвергшийся замораживанию) и далее в условиях криоконсервации через 7 дней, 1 месяц (30 суток), 3 месяца (90 суток), 6 месяцев (180 суток) и 12 месяцев (365 суток). Для этого из каждого заполненного гемакона с фекальным фильтратом проводился забор материала в 6 маркированных стерильных пробирок конической формы с интегрированной крышкой типа Eppendorf объемом 1,5 мл. Таким образом, от каждого донора исследовано по 6 образцов.

Изучение качественного и количественного состава микробиоты фекального трансплантата проводилось согласно методическим рекомендациям «Бактериологическая диагностика дисбактериоза», утвержденным Министерством здравоохранения СССР 14.04.1997 и актуализированным 01.02.2020 на базе лаборатории клинической микробиологии Научно-исследовательского

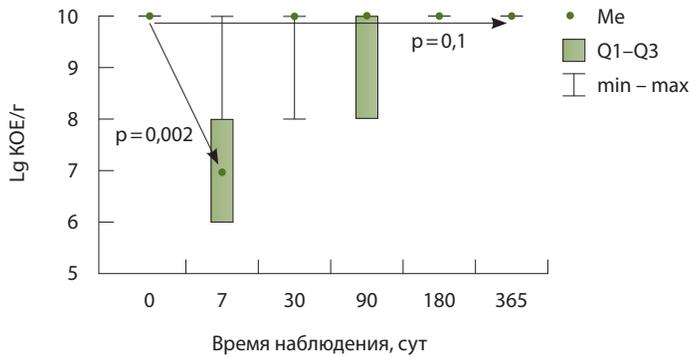


Рис. 2. Бифидобактерии (в условиях криоконсервации способны сохранять жизнеспособность до 365 суток)

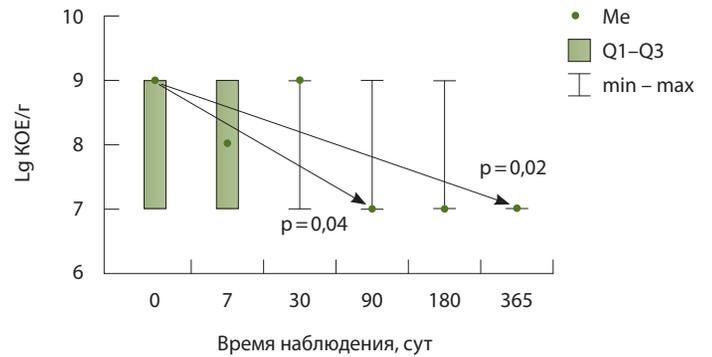


Рис. 3. Лактобактерии (в течение первого месяца хранения остаются в неизменном количественном составе, к 90-м суткам отмечается снижение медианы с 9,0 до 7,0 Lg KOE/g, на этом уровне они сохраняются в течение года в условиях криоконсервации)

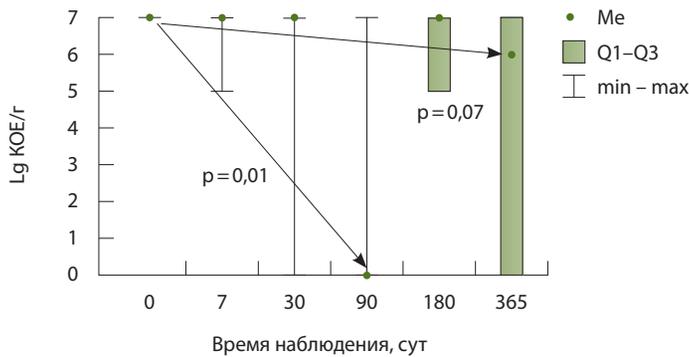


Рис. 4. Энтерококки (способны оставаться в неизменном количественном составе при ультразвуковых температурных режимах до 180 суток, в последующем отмечается снижение их концентрации)

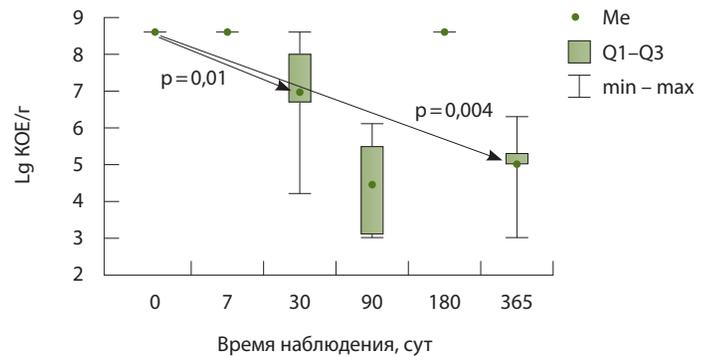


Рис. 5. *E. coli* (концентрация *E. coli* в замороженном фильтрате не изменяется при хранении до 6 месяцев (180 суток), при дальнейшем хранении происходит достоверное снижение концентрации)

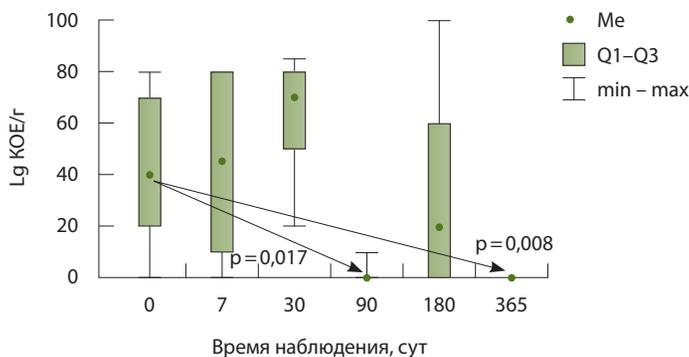


Рис. 6. Лактозоотрицательные кишечные палочки (микроорганизмы, наиболее чувствительные к ультразвуковым температурным режимам, их концентрация в фекальном фильтрате достоверно снижается к 7-м суткам)

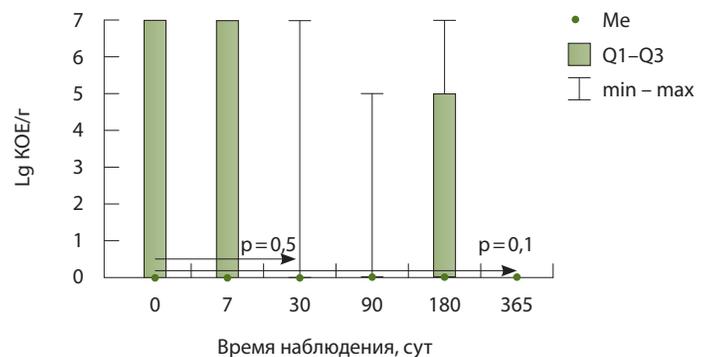


Рис. 7. Клостридии (концентрация клостридий в условиях криоконсервации -80 °С снижается к 180-м суткам (6 месяцев), к 365-м суткам они не обнаруживаются)

института биомедицинских технологий ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России (лицензия № 38.ИЦ.06.001.Л.000001.0108 от 14.01.2008, срок действия – бессрочно) путем посева соответствующих десятикратных разведений

фекального фильтрата на питательные среды – Эндо, Плоскирева, кровяной агар, желточно-солевой агар, энтерококк-агар, лактоагар, среды Вильсона – Блера, Блаурокка, Сабуро. После инкубации в течение 24–48 часов в аэробных

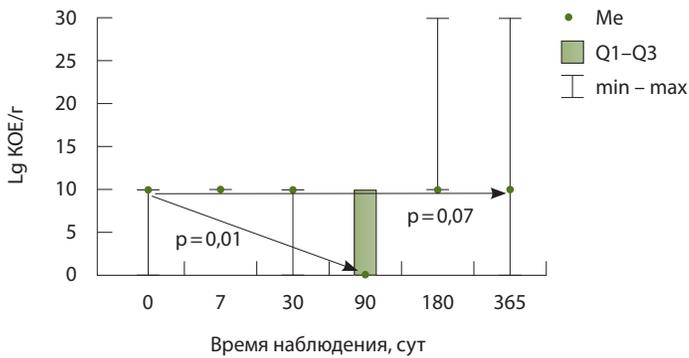


Рис. 8. Кокковые формы микробов (показали криопротективные свойства при длительном хранении при температуре -80 °С, их количество к 365-м суткам не изменилось)

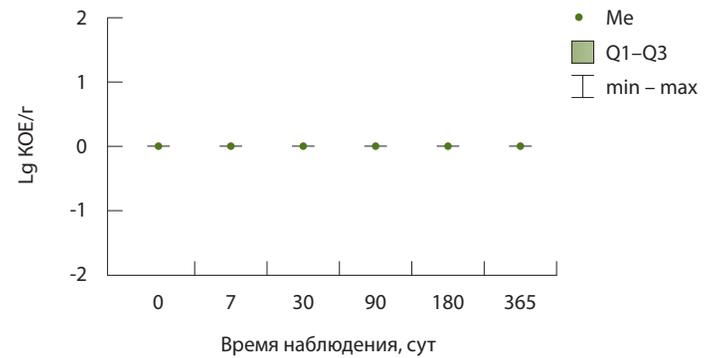


Рис. 9. Дрожжеподобные грибы рода *Candida* (в исследованном фекальном фильтрате не обнаружены)

и анаэробных условиях подсчитывали число типичных колоний для каждого вида микроорганизмов, определяли колониеобразующие единицы (КОЕ) и рассчитывали их десятичный логарифм (lg КОЕ). Проводилась идентификация выделенных культур с определением чувствительности к антибактериальным препаратам.

Протокол данного исследования одобрен на заседании локального этического комитета ФГБНУ ИНЦХТ (протокол № 5 от 18.07.2018).

Для статистической обработки полученных результатов использовали программный пакет Statistica 10.0 для Windows. Определение значимости различий полученных данных (p) в сравнимых выборках проводили по критерию Манна – Уитни, Вилкоксона. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты «выживаемости» полученных образцов фильтрата обобщены в таблице. В ходе анализа выяснилось, что один из основных видов микроорганизмов нормофлоры – бифидобактерии – сохраняется в условиях криоконсервации при температуре -80 °С в течение 365 суток (12 месяцев) (рис. 2). Однако лактобактерии оказались менее устойчивыми к ультранизким температурным режимам: было отмечено, что в течение 30 суток они остаются в неизменном количественном составе, но к 90-м суткам отмечается снижение медианы с 9,0 до 7,0 lg КОЕ/г, на этом уровне они сохраняются к 365-м суткам (рис. 3), что не имеет клинического значения, поскольку укладывается в рамки нормальных показателей для взрослого человека. Другие представители нормальной микрофлоры кишечника – энтерококки и кишечная палочка *E. coli* (рис. 4, 5), в том числе кишечная палочка со сниженной ферментативной

активностью, достоверно сохраняются в условиях криоконсервации в течение 180 суток, затем при более длительном хранении (к 365-м суткам) происходит снижение их концентрации. Представитель условно-патогенной флоры – лактозоотрицательная кишечная палочка – оказалась более чувствительной к низким температурным режимам: снижение ее количества отмечено уже к 7-м суткам (рис. 6), что косвенным образом позволяет предположить более низкую вероятность развития дисбиотических нарушений после фекальной трансплантации при длительном хранении фильтрата. Концентрация клостридий в целом в условиях криоконсервации также снижается к 180-м суткам (6 месяцев), и к 365-м суткам они не выявляются (рис. 7). Кокковые формы микробов, которые тоже относятся к представителям условно-патогенных микроорганизмов, показали криопротективные свойства при длительном хранении при температуре -80 °С, о чем свидетельствует их неизменное количество к 365-м суткам (рис. 8). Грибы рода *Candida* в исследованном материале обнаружены не были (рис. 9).

Анализ микробного состава свежеприготовленного нативного фильтрата микробиоты (0-й день) и каловых масс донора перед подготовкой трансплантата качественных и количественных различий не выявил.

Чувствительность выделенных микроорганизмов донорского биоматериала, в частности *E. coli* и энтеробактерий, к антибиотикам групп цефалоспоринов, полусинтетических пенициллинов, карбапенема, аминогликозидов, фторхинолонов, наиболее часто применяемых в клинической практике, достигала 100%. Резистентность к исследуемым микроорганизмам выявлена у амоксициллина в сочетании



с клавулановой кислотой, который имеет ограниченное применение в гастроэнтерологии и колопроктологии.

Таким образом, проведенное исследование позволило констатировать следующее:

- аппаратный метод подготовки биоматериала к фекальной трансплантации удобный, непродолжительный по времени и минимизирует контакт с внешней средой;
- качественных и количественных различий в микробном составе между каловыми массами донора и свежеприготовленным фильтратом обнаружено не было;
- подготовленный по оригинальной методике биоматериал может храниться в «банке» микробиоты до 12 месяцев, однако оптимальным по микробному составу следует считать трансплантат со сроком хранения до 6 месяцев.

В связи с высокой чувствительностью исследованных микроорганизмов трансплантата к антибиотикам широкого спектра действия после выполнения процедуры ТФМ рекомендуется избегать назначения антибактериальной терапии.

Обсуждение

В настоящее время доказана роль «аномального» микробиома (дисбиоза) в патогенезе многих заболеваний и расстройств [23]. Результаты опубликованных РКИ показывают многообещающую эффективность ТФМ и, соответственно, определяют необходимость разработки национальных стандартизованных протоколов, включающих все этапы процедуры и правовые аспекты. Подобный консенсус опубликован экспертами стран Европы, Северной Америки и Австралии [24], однако некоторые позиции остаются спорными. В частности, в ряде исследований предлагаются сроки хранения фекального фильтрата до 2 лет, но уровень доказательности сами авторы признают низким. В экспериментальном исследовании Z.D. Jiang и соавт. (2017) [25] замороженные и лиофилизированные продукты для ТФМ хранили до 7 месяцев без потери видового и количественного состава микробиоты и терапевтической

эффективности. Исследователи полагают, что предложенная экспериментальная модель на животных может быть полезна для изучения стабильности микробиоты человека, предназначенной для ТФМ. В нашем исследовании мы оценивали выживаемость трансплантата в течение 365 дней (12 месяцев). Оптимальным считаем 6-месячный образец, хотя возможно применение подготовленного материала в течение года при хранении в условиях криоконсервации (-80 °С). Дальнейшее хранение нецелесообразно вследствие обеднения нормофлоры полученного биоматериала за счет кишечной палочки и энтерококков.

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, показали: предложенный аппаратный способ подготовки биоматериала для фекальной трансплантации удобен и несложен в выполнении, позволяет приготовить трансплантат в условиях, минимизирующих внешнюю микробную контаминацию, обеспечить оптимальный срок хранения и безопасность подготовленного субстрата.

Заключение

Большое количество опубликованных за последние 5 лет статей, посвященных ТФМ, в том числе результатов РКИ, отражает растущий интерес к изучению микробиоты человека и методам ее коррекции. Несомненно, аппаратный способ подготовки фекального трансплантата представляется более приемлемым в условиях современных технологий по сравнению с общепринятым методом подготовки донорского материала путем фильтрации фекальных масс через марлевые или кофейные фильтры с ручным пособием. Очевидно также, что в ближайшем будущем будут предложены протоколы стандартизации и внедрены в клиническую практику прогрессивные методики процедуры ТФМ. Впервые в Российской Федерации разработан и зарегистрирован бесконтактный аппаратный метод подготовки биоматериала для проведения процедуры фекальной трансплантации. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Л.Р. Шедоева – концепция и дизайн статьи, поиск и анализ литературы, непосредственное участие в подготовке фекального фильтрата, анализ и обработка материала, написание текста статьи; Е.Ю. Чашкова – концепция статьи, поиск и анализ литературы, анализ и обработка материала, написание и редактирование текста статьи, финальное утверждение рукописи; О.Г. Карноухова –

проведение бактериологического исследования, обработка полученных результатов, редактирование текста; Г.Ю. Коган – проведение бактериологического исследования, обработка полученных результатов микробиологического исследования. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.



Литература / References

1. van Nood E, Vriee A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuisper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG, Keller JJ. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2013;368(5):407–15. doi: 10.1056/NEJMoa1205037.
2. Youngster I, Sauk J, Pindar C, Wilson RG, Kaplan JL, Smith MB, Alm EJ, Gevers D, Russell GH, Hohmann EL. Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. *Clin Infect Dis*. 2014;58(11):1515–22. doi: 10.1093/cid/ciu135.
3. Cammarota G, Masucci L, Ianiro G, Bibbò S, Dinoi G, Costamagna G, Sanguinetti M, Gasbarrini A. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(9):835–43. doi: 10.1111/apt.13144.
4. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, McFarland LV, Mellow M, Zuckerbraun BS. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(4):478–98; quiz 499. doi: 10.1038/ajg.2013.4.
5. Sokol H, Galperine T, Kapel N, Bourlioux P, Seksik P, Barbut F, Scanzi J, Chast F, Batista R, Joly F, Joly AC, Collignon A, Guery B, Beaugerie L; French Group of Faecal microbiota Transplantation (FGFT). Faecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridium difficile* infection: Recommendations from the French Group of Faecal microbiota Transplantation. *Dig Liver Dis*. 2016;48(3):242–7. doi: 10.1016/j.dld.2015.08.017.
6. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, Sokol H, Arkkila P, Pintus C, Hart A, Segal J, Aloï M, Masucci L, Molinaro A, Scaldaferrì F, Gasbarrini G, Lopez-Sanroman A, Link A, de Groot P, de Vos WM, Högenauer C, Malfertheiner P, Mattila E, Milosavljević T, Nieuwdorp M, Sanguinetti M, Simren M, Gasbarrini A; European FMT Working Group. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*. 2017;66(4):569–80. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313017.
7. Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A, Moore T, Wu G. Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology*. 2015;149(1):223–37. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.008.
8. Шельгин ЮА, Головенко ОВ, Головенко АО, Сухина МА. Трансплантация фекальной микробиоты – перспективы применения при заболеваниях кишечника (обзор литературы). *Колопроктология*. 2015;4(54):65–73. [Shelygin UA, Golovenko OV, Golovenko AO, Sukhina MA. [Fecal microbiota transplantation – perspectives of use in bowel diseases (review)]. *Koloproktologia [Coloproctology]*. 2015;4(54):65–73. Russian.]
9. Sood A, Mahajan R, Singh A, Midha V, Mehta V, Narang V, Singh T, Singh Pannu A. Role of Faecal Microbiota Transplantation for Maintenance of Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Pilot Study. *J Crohns Colitis*. 2019;13(10):1311–7. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz060.
10. Cui B, Li P, Xu LJ, Peng Z, Zhao Y, Wang H, He Z, Zhang T, Ji G, Wu K, Fan D, Zhang F. Fecal microbiota transplantation is an effective rescue therapy for refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm Cell Signal*. 2015;2:757. doi: 10.14800/ics.757.
11. Satokari R, Mattila E, Kainulainen V, Arkkila PE. Simple faecal preparation and efficacy of frozen inoculum in faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection – an observational cohort study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(1):46–53. doi: 10.1111/apt.13009.
12. Orenstein R, Dubberke E, Hardi R, Ray A, Mullane K, Pardi DS, Ramesh MS; PUNCH CD Investigators. Safety and Durability of RBX2660 (Microbiota Suspension) for Recurrent *Clostridium difficile* Infection: Results of the PUNCH CD Study. *Clin Infect Dis*. 2016;62(5):596–602. doi: 10.1093/cid/civ938.
13. Ishikawa D, Sasaki T, Osada T, Kuwahara-Arai K, Haga K, Shibuya T, Hiramatsu K, Watanabe S. Changes in Intestinal Microbiota Following Combination Therapy with Fecal Microbial Transplantation and Antibiotics for Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;23(1):116–25. doi: 10.1097/MIB.0000000000000975.
14. Rossen NG, Fuentes S, van der Spek MJ, Tijssen JG, Hartman JH, Duflo A, Löwenberg M, van den Brink GR, Mathus-Vliegen EM, de Vos WM, Zoetendal EG, D'Haens GR, Ponsioen CY. Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2015;149(1):110–8.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.03.045.
15. Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, Libertucci J, Wolfe M, Onischi C, Armstrong D, Marshall JK, Kassam Z, Reinisch W, Lee CH. Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*. 2015;149(1):102–9.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.001.
16. Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, Walsh AJ, van den Bogaerde J, Samuel D, Leong RWL, Connor S, Ng W, Paramsothy R, Xuan W, Lin E, Mitchell HM, Borody TJ. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017;389(10075):1218–28. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30182-4.
17. Costello SP, Hughes PA, Waters O, Bryant RV, Vincent AD, Blatchford P, Katsikeros R, Makanyanga J, Campaniello MA, Mavrangelos C, Rosewarne CP, Bickley C, Peters C, Schoeman MN, Conlon MA, Roberts-Thomson IC, Andrews JM. Effect of Fecal Microbiota Transplantation on 8-Week Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019;321(2):156–64. doi: 10.1001/jama.2018.20046.
18. Kump P, Wurm P, Gröchenig HP, Wenzl H, Petritsch W, Halwachs B, Wagner M, Stadlbauer V, Eherer A, Hoffmann KM, Deutschmann A, Reicht G, Reiter L, Slawitsch P, Gorkiewicz G, Högenauer C. The taxonomic composition of the donor intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of faecal microbiota transplantation in therapy refractory ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(1):67–77. doi: 10.1111/apt.14387.
19. Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ, Khoruts A. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(5):761–7. doi: 10.1038/ajg.2011.482.
20. OpenBiome [Internet]. Available from: <http://www.openbiome.org>.
21. Zhang T, Lu G, Zhao Z, Liu Y, Shen Q, Li P, Chen Y, Yin H, Wang H, Marcella C, Cui B, Cheng L, Ji G, Zhang F. Washed microbiota transplantation vs. manual fecal microbiota transplantation: clinical findings, animal studies and in vitro screening. *Protein Cell*. 2020;11(4):251–66. doi: 10.1007/s13238-019-00684-8.
22. Апарцин КА, Кулундуков АА, Чашкова ЕЮ, авторы; ФГБНУ ИНЦХТ, ФГБУН ИНЦ СО РАН, патентообладатели. Устройство для подготовки донорского фекального материала к трансплантации. Пат. 2659417 Рос. Федерация. Оpubл. 02.07.2018. [Aparsin KA, Kulundukov AA, Chashkova EYu, inventors; FGBNU INTSKHT, FGBUN INTS SO RAN, assignees. A device for preparing donor fecal material for transplantation. Russian Federation patent 2659417. 2018 Jul 2.]
23. Dupont HL, Jiang ZD, Dupont AW, Utay NS. The intestinal microbiome in human health and disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2020;131:178–97.
24. Cammarota G, Ianiro G, Kelly CR, Mullish BH, Allegretti JR, Kassam Z, Putignani L, Fischer M, Keller JJ, Costello SP, Sokol H, Kump P, Satokari R, Kahn SA, Kao D, Arkkila P, Kuisper EJ,



Vehreschild MJG, Pintus C, Lopetuso L, Maccusci L, Scaldaferrì F, Terveer EM, Nieuw-dorp M, López-Sanromán A, Kupcinskis J, Hart A, Tilg H, Gasbarrini A. International consensus conference on stool banking for faecal

microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*. 2019;68(12):2111–21. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319548.

25. Jiang ZD, Alexander A, Ke S, Valilis EM, Hu S, Li B, DuPont HL. Stability and efficacy of fro-

zen and lyophilized fecal microbiota transplant (FMT) product in a mouse model of *Clostridium difficile* infection (CDI). *Anaerobe*. 2017;48:110–4. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.08.003.

The hardware method of biomaterial preparation for fecal transplantation

L.R. Shedoeva¹ • E.Yu. Chashkova¹ • O.G. Karnoukhova² • G.Yu. Kogan²

Background: Nowadays fecal transplantation (FT) is considered as a component of the treatment for a wide range of disorders, including autoimmune diseases (ulcerative colitis, Crohn's disease, type 1 diabetes mellitus and insulin resistance, multiple sclerosis, psoriasis). High-quality preparation of the biomaterial is a necessary procedure that allows for long-time storage of the prepared fecal transplant at ultralow temperature conditions and its use as needed.

Aim: To optimize the method of preparation of the biomaterial for fecal transplantation and to evaluate its "survival" at different time points under cryopreservation conditions.

Materials and methods: A device for the preparation of donor fecal material for transplantation has been developed and proposed (the Russian Federation patent No. 2659417 from July 2, 2018). Donor fecal material (collected in a sterile container on the same day of preparation in the morning), the solvent, and glycerol are homogenized automatically in the closed loop device and passed through a disposable filter with attached sterile hemocon container. Freezing at ultralow temperature (cryopreservation at -80 °C) allows for long time storage of this fecal graft. We studied the microbial composition of the obtained native substrate and samples that were cryopreserved at different time points (7 to 365 days).

Results: The proposed original method makes it possible to prepare the biomaterial for storage at

a low temperature mode without any contact, in a closed loop, for subsequent fecal transplantation within 6–12 months. The analysis of the fecal transplant at different time points has shown no qualitative and quantitative differences in the microbial composition between the native donor material and the freshly prepared filtrate. The biomaterial prepared according to the original method is stable for 12 months.

Conclusion: The proposed hardware method for preparing the biomaterial for fecal transplantation is easy to use and allows for the preparation of a graft with minimal external microbial contamination, in contrast to the conventional method of donor material preparation by filtering fecal matter through gauze or coffee filters with manual assistance.

Key words: fecal microbiota transplantation, hardware method of preparing fecal transplant, fecal transplant survival

For citation: Shedoeva LR, Chashkova EYu, Karnoukhova OG, Kogan GYu. The hardware method of biomaterial preparation for fecal transplantation. *Almanac of Clinical Medicine*. 2020;48(6):403–11. doi: 10.18786/2072-0505-2020-48-060.

Received 5 October 2020; revised 12 November 2020; accepted 13 November 2020; published online 27 November 2020

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' contributions

L.R. Shedoeva, the paper concept and design, literature search and analysis, data analysis and management, text writing; E.Yu. Chashkova, concept of the paper, literature search and analysis, data analysis and management, text writing and editing, approval of the final version of the manuscript; O.G. Karnoukhova, bacteriological study, management of the results, text editing; G.Yu. Kogan, bacteriological study, management of the microbiological results. All the authors have contributed significantly to the study conduct and preparation of the paper, have read and approved its final version before the publication.

Liudmila R. Shedoeva – MD, Coloproctologist, Junior Research Fellow, Laboratory of Reconstructive Surgery, Scientific Department of Clinical Surgery¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6525-3522>
✉ 100 mikrorayon Yubileynyy, Irkutsk, 664049, Russian Federation (Regional Order "Badge of Honor" Clinical Hospital, Coloproctology Department, 9th floor). Tel.: +7 (924) 609 12 89. E-mail: cristal608@yandex.ru

Elena Yu. Chashkova – MD, PhD, Coloproctologist, Leading Research Fellow, Head of Laboratory of Reconstructive Surgery, Scientific Department of Clinical Surgery¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7953-6523>

Olga G. Karnoukhova – MD, PhD, Bacteriologist, Associate Professor, Chair of Pathophysiology and Clinical Laboratory Diagnostics²

Galina Yu. Kogan – MD, Bacteriologist, Assistant, Chair of Pathophysiology and Clinical Laboratory Diagnostics²

¹ Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology; 1 Bortsov Revolyutsii ul., Irkutsk, 664003, Russian Federation

² Irkutsk State Medical University; 1 Krasnogo Vosstaniya ul., Irkutsk, 664003, Russian Federation