

**Academia  
Oamenilor de Știință  
din România**



**Academy  
of Romanian  
Scientists**

Add: Str. Ilfov nr. 3 sector 5, 050045, București, ROMANIA, Cod Fiscal: 5091859  
Tel. 00-4021/314.74.91; Fax. 00-4021/314.75.39, Web-site: [www.aosr.ro](http://www.aosr.ro), E-mail: [aosromania@yahoo.com](mailto:aosromania@yahoo.com)

Domeniul- Monitorizarea sechelelor postinfecție acută cu SARS-CoV-2

**Evaluarea microbiomului și a profilului inflamator la pacienții diabetici postinfecție  
acută cu SARS-CoV-2**

**Raport intermediar 3 – Iunie 2023**

**Membri echipă proiect**

**CS II Dr. Grațiela Grădișteanu – director**

**Lect. Univ.Dr. Ilda Barbu – membru**

**Drd. Georgiana Grigore**

## Introducere

Proiectul propus are ca scop investigarea modificărilor microbiomului induse de infecția cu SARS-CoV-2 la pacienții cu diabet de tip 2 (DZ2), în comparație cu un grup martor sănătos. Obiectivul principal este dezvoltarea unui panel de markeri de microbiom și de profil inflamator care să poată fi utilizate pentru prognosticul și tratamentul personalizat al pacienților diabetici după infecția cu COVID-19.

Infecția cu SARS-CoV-2 poate afecta diferite organe și sisteme din corp, iar formele severe de COVID-19 sunt asociate cu un răspuns imun exacerb care poate duce la insuficiență sistemică de organ (Fung, 2021). Pneumonia și sindromul de detresă respiratorie acută (ARDS) sunt manifestări clinice grave ale COVID-19 și apar mai frecvent la pacienții vârstnici și imunocompromiși (Wang, 2020; Zhang, 2022; Zhou, 2021).

Este interesant de menționat că SARS-CoV-2 poate fi detectat și în probele de scaun ale pacienților infectați, sugerând o posibilă legătură între plămâni și intestin. Acest lucru se datorează faptului că virusul utilizează receptorii ACE2 prezenți pe celulele epiteliale alveolare pentru a infecta plămâni. Studii anterioare au evidențiat existența unei comunicări bidirecționale între microbiota intestinală și plămâni, numită "axa intestin-plămân" (Wu, 2020; Dumas, 2018). Astfel, microbiota intestinală poate avea un impact semnificativ asupra sănătății pulmonare.

În cazul COVID-19, s-au observat modificări ale semnăturilor microbiomului intestinal la pacienții infectați, în special la cei care au primit tratament cu antibiotice pe parcursul spitalizării (Lau, 2022; Zuo, 2020, Gu, 2020). Simptomele gastrointestinale sunt, de asemenea, frecvent raportate la pacienții cu COVID-19. Diversitatea microbiotei intestinale și prezența anumitor microorganisme pot juca un rol important în evoluția bolii.

Pacienții cu diabet de tip 2 și alte comorbidități, cum ar fi tulburările cardiovasculare, prezintă un risc mai mare în combaterea infecției cu SARS-CoV-2. Astfel, este important să înțelegem cum infecția afectează microbiomul acestor pacienți și să identificăm markeri de prognostic și tratament personalizat.

Prin intermediul acestui proiect, s-a investigat microbiomul pacienților cu diabet de tip 2 afectați de COVID-19 în comparație cu un grup martor sănătos. S-au căutat modificări în diversitatea microbiotei intestinale și markeri specifici ai microbiomului și inflamației asociate.

Aceste informații pot fi utilizate pentru dezvoltarea unui instrument inovator de prognostic clinic, care poate fi util și în alte boli inflamatorii sau infecții virale.

## Rezultate

Studiul a inclus un grup de pacienți diabetici (n=15) recrutați la Institutul Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice "N.C. Paulescu", precum și un grup de control format din indivizi sănătoși (n=15). Toți participanții au oferit consimțământul informat în conformitate cu formularul aprobat de Comisia de Etică a Institutului de Cercetări al Universității din București. Diagnosticul infecției cu SARS-CoV-2 a fost realizat utilizând Real Time PCR cu ajutorul kitului Genesig® COVID-19 2G (PRIMER DESIGN, UK).

Pentru analiza microbiomului orofaringian, ADN-ul a fost extras din probele de la pacienți utilizând kitul DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) conform instrucțiunilor producătorului. Secvențele ARNr 16S au fost amplificate din ADN-ul extras din probele de la pacienți folosind perechi de primeri specifici pentru regiunea hipervariabilă V3-V4 a genei ARNr 16S. Aceasta amplificare a permis obținerea unei zone specifice a genei care este utilizată pentru identificarea bacteriilor și pentru analiza diversității microbiotei. Produsele PCR obținute prin amplificarea regiunilor hipervariabile ale genei ARNr 16S au fost purificate prin separare electroforetică și apoi prin purificare cu bile magnetice (AmPure XP Beckman Coulter). Bibliotecile de ampliconi obținute au fost secvențiate pe un cip 316 folosind sistemul Ion Torrent PGM și kitul Ion Sequencing 400, urmând instrucțiunile producătorului. Această tehnologie de secvențiere permite obținerea secvențelor de ADN corespunzătoare diverselor organisme microbiene prezente în probele de secreții orofaringiene. Datele de secvențiere obținute au fost procesate utilizând pipeline-ul Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME). Acest pipeline este utilizat pentru analiza datelor de secvențiere de microbiom și permite determinarea compoziției și diversității microbiotei. Pentru a calcula măsurile de diversitate, unitățile taxonomice operaționale (OTU) ale genei 16S ARNr au fost definite la o omologie de secvență de cel puțin 97%. Aceasta înseamnă că secvențele similare la nivel de 97% au fost grupate împreună pentru a forma aceste unități. În final, analiza secvențelor obținute a fost realizată utilizând software-ul Ion Reporter, iar rezultatele au fost interpretate pentru a înțelege modificările microbiotei la pacienții diabetici după infecția cu SARS-CoV-2.



Figura 1. Microbiomul respirator post SARS-CoV-2 – individ fara DZ2

Analiza microbiomului respirator la indivizii control post SARS-CoV-2 este dominata de specii precum *Neisseria*, *Pasteurellaceae*, *Veillonaceae* si *Clostridiaceae* (Figura 1).

In cazul indivizilor diabetici, ca urmare a infectiei cu SARS-CoV-2 , se observa o disbioza caracterizata de nivele foarte ridicate de Streptococaceae (Figura 2).

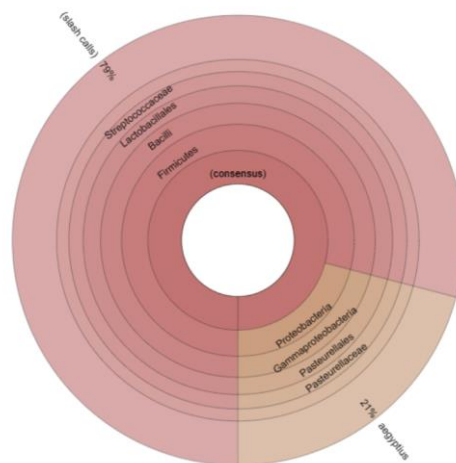
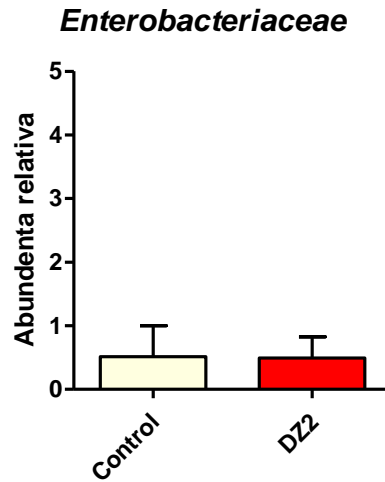


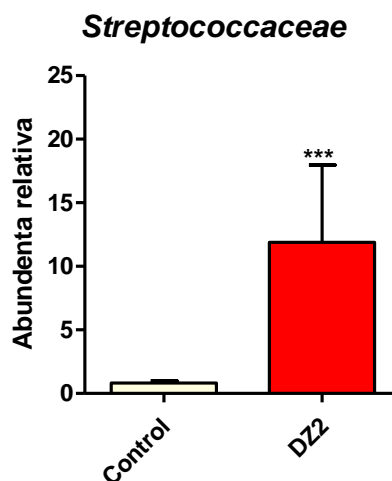
Figura 2. Microbiomul respirator post SARS-CoV-2 – pacient DZ2

Daca in cazul microbiotei intestinale s-au observat nivele ridicate de Enterobacteriaceae in cazul indivizilor diabetic, acest lucru nu a fost valabil si in cazul probelor de la nivelul orofaringian. In cazul acestora, microbiota a fost caracterizata de nivele scazute de Enterobacteriaceae (Figura 3).

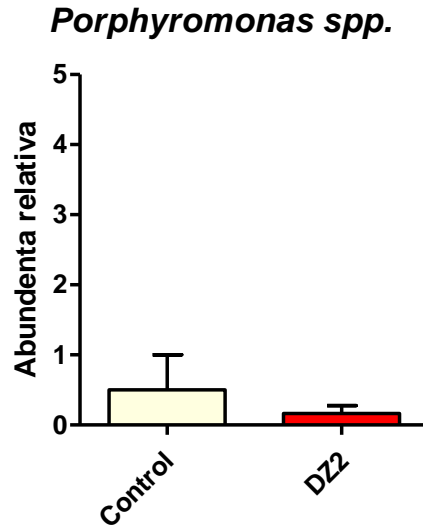


**Figura 3.** Nivele relative de *Enterobacteriaceae*- probe de la nivelul tractului respirator

S-a observat însă ca indivizii diabetici prezintă nivele semnificativ crescute de *Streptococcaceae* (Figura 4). Aceste rezultate sunt în acord cu datele din literatura care au raportat co-infecții cu *Streptococcus pneumoniae* în cazul pacienților COVID-19 (Vazquez, 2021). În ceea ce privește alți membri ai microbiomului respirator (ex. *Porphyromonas spp.*) nu s-au înregistrat diferențe semnificative între cele 2 loturi de subiecți analizați (Figura 5)

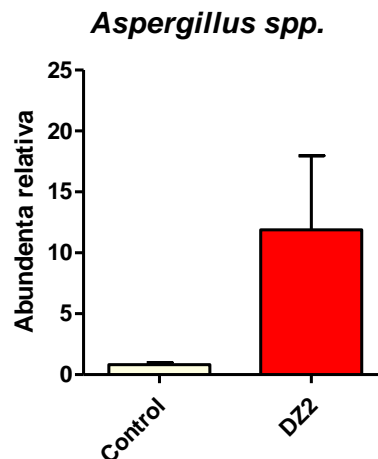


**Figura 4.** Nivele relative de *Streptococcaceae*- probe de la nivelul tractului respirator



**Figura 5.** Nivele relative de *Porphyromonas*- probe de la nivelul tractului respirator

Analiza microbiomului respirator a evidentiat nivele ridicate de *Aspergillus* in probele recoltate de la invivizi diabetici post-SARS-CoV-2 (Figura 6). Astfel, microbiota este modificata si la nivel intestinal precum si nivel respirator in urma infectiei cu SARS-CoV-2.



**Figura 6.** Nivele relative de *Aspergillus*- probe de la nivelul tractului respirator

Am corelat principalii taxoni identificați în intestine si la nivle respirator cu parametrii clinici ai pacientului, cum ar fi încărcătura virală, stresul oxidativ (ROS, NOS), exprimarea NADPH oxidazei, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-17, proteina C reactiva.

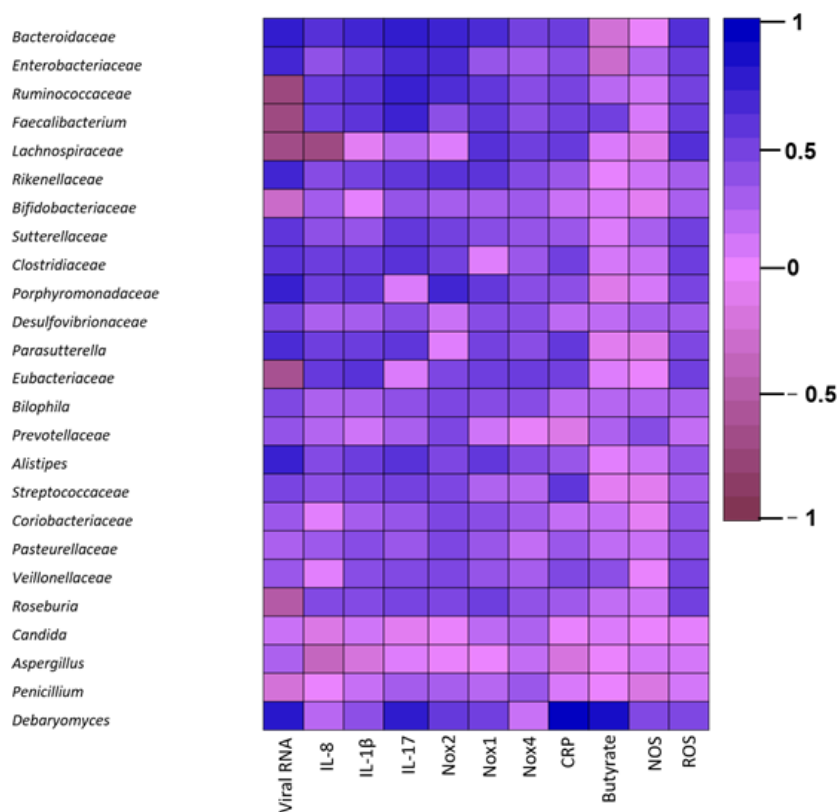


Figura 7. Corelatii microbiom-parametri clinici , post SARS-CoV-2

Încărcătura virală a fost asociată pozitiv cu anumite familii bacteriene precum *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Rickenellaceae*, *Porphyromonadaceae* și specii bacteriene precum *Parasutterella* și *Alistipes*. În schimb, nivelurile de ARN viral au fost corelate negativ cu *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae*, *Bifidobacteriaceae* și *Eubacteriaceae*. Aceste constatări sugerează o asociere între compoziția microbiotei și nivelurile de infecție virală. Stresul oxidativ, exprimat prin nivelurile de specii reactive de oxigen (ROS), a prezentat corelații pozitive cu anumite familii bacteriene, inclusiv *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* și *Faecalibacterium*. Aceste corelații sugerează o legătură între producția de ROS și compoziția microbiotei respiratorii. De asemenea, s-au observat corelații între nivelurile de citokine inflamatorii, cum ar fi IL-8 și IL-1 $\beta$ , și anumite familii bacteriene. De exemplu, nivelurile crescute de IL-8 au fost asociate pozitiv cu *Enterobacteriaceae*, *Sutterella*, *Bacteroidaceae* și *Clostridiaceae*. În schimb, nivelurile crescute de IL-1 $\beta$  au prezentat o corelație negativă cu *Lachnospiraceae*. Expresia genelor implicate în producția de NADPH oxidaze (Nox) a fost corelată pozitiv cu anumite familii bacteriene precum *Enterobacteriaceae*, *Rickenellaceae* și *Sutterella*. Aceasta sugerează o posibilă interacțiune între microbiota și producția de ROS prin intermediul enzimelor NADPH oxidaze. Proteina C reactivă, un marker inflamator, a prezentat corelații pozitive cu membri ai

microbiotei precum *Enterobacteriaceae*, *Alistipes*, *Sutterella* și *Bacteroidaceae*. Nu s-au găsit corelații semnificative statistic între nivelurile de specii reactive de azot (NOS) și principalele membri ai microbiotei. Aceste rezultate sugerează că există o asocieră complexă între microbiota intestinală, microbiota respiratorie și parametrii clinici, cum ar fi încărcătura virală, stresul oxidativ, inflamația și expresia genelor implicate în răspunsul imun.

Nivelele crescute de Streptococcaceae la nivelul microbiotei tractului respirator au fost corelate pozitiv cu încărcătura virală și proteina C reactivă. Restul taxonilor identificați în probele de la nivelul tractului respirator superior nu au fost corelați statistic cu parametrii clinici ai pacienților.

## Concluzii

Rezultatele obținute în cadrul acestui proiect contribuie la o mai bună înțelegere a interacțiunii dintre microbiomul intestinal, sistemul imunitar și infecția cu SARS-CoV-2 la pacienții cu diabet de tip 2. De asemenea, aceste rezultate pot ajuta la dezvoltarea unor strategii de tratament personalizat și intervenții terapeutice specifice, adaptate nevoilor individuale ale pacienților cu diabet de tip 2 afectați de COVID-19.

## Diseminarea rezultatelor

- 1. Prezentare orală** - ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), Lisabona, Portugalia (23-26 Aprilie 2022) -prezentare orală - Gut microbiome profiles in type 2 diabetes patients after COVID-19 Abstract / Presentation Number: 348/O0194
- 2. Prezentare orală** - 41<sup>st</sup> International Congress of the Society for Microbial Ecology in Health and Disease (SOMED) -14.06.2022 Exploring the gut-lung axis in COVID-19
- 1. Poster SESIUNEA DE COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE „D. BRANDZA”** Ediția a XXVIII-a, 4-5.11.2022, Analiza rezistomului asociat diabetului zaharat de tip 2- Grațiela GRĂDIȘTEANU PÎRCĂLĂBIORU, Ilda BARBU, Irina GHEORGHE-BARBU, Georgiana GRIGORE, Octavian SAVU, Mariana-Carmen CHIFIRIUC
- 3.** Gradisteanu Pircalabioru, G.; Chifiriuc, M.-C.; Picu, A.; Petcu, L.; Trandafir, M.; Savu, O. Snapshot into the Type-2-Diabetes-Associated Microbiome of a Romanian Cohort. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, Nov 30;23(23):15023. doi: 10.3390/ijms232315023. ( ISI, Factor impact=6)
- 4.** Gradisteanu Pircalabioru G, Grigore GA, Czobor Barbu I, Chifiriuc MC, Savu O. Impact of COVID-19 on the Microbiome and Inflammatory Status of Type 2 Diabetes Patients. *Biomedicines*. 2023 Jan 11;11(1):179. doi: 10.3390/biomedicines11010179 (ISI, factor impact= 4,75)

## Referințe bibliografice



1. Fung, M.; Babik, J.M. COVID-19 in Immunocompromised Hosts: What We Know So Far. *Clin Infect Dis.* **2021** Jan 27;72(2):340-350. doi: 10.1093/cid/ciaa863.



2. Wang, C.; Horby, P.W.; Hayden, F.G.; Gao, G.F. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. **2020**:470–473. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
3. Dumas, A.; Bernard, L, Poquet Y, Lugo-Villarino G, Neyrolles, O. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell Microbiol*. **2018** Dec;20(12):e12966. doi: 10.1111/cmi.12966.
4. Wu, Y.; Guo, C.; Tang, L.; Hong, Z.; Zhou, J.; Dong, X,et al . Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol*. **2020**;1253(20):20–21. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30083-2.
5. Lau, R.I.; Zhang, F.; Liu, Q, Su Q, Chan FKL, Ng SC. Gut microbiota in COVID-19: key microbial changes, potential mechanisms and clinical applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. **2022** Oct 21:1–15. doi: 10.1038/s41575-022-00698-4.
6. Anton-Vazquez V, Clivillé R. Streptococcus pneumoniae coinfection in hospitalised patients with COVID-19. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021 Jun;40(6):1353-1355. doi: 10.1007/s10096-021-04166-w. Epub 2021 Jan 19
7. Zuo, T.; Zhang, F.; Lui, G.C.Y.; Yeoh, Y.K.; Li, A.Y.L.; Zhan, H,et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*. **2020** Sep;159(3):944-955.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2020.05.048.
8. Liu, Y.; Zhang, H.; Tang, J.; Jiang, X.; Yan, X.; Liu X, et al. Distinct metagenomic signatures in the SARS-CoV-2 infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. **2021**;11:1019. doi: 10.3389/fcimb.2021.706970
9. Zhang, H.; Wu, Y.; He, Y.; Liu, X.; Liu, M.; Tang Y et al. Age-Related Risk Factors and Complications of Patients With COVID-19: A Population-Based Retrospective Study. *Front Med (Lausanne)*. **2022** Jan 11;8:757459. doi: 10.3389/fmed.2021.757459.
10. Zhou, Y.; Chi, J.; Lv, W.; Wang, Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab Res Rev*. **2021** Feb;37(2):e3377. doi: 10.1002/dmrr.3377

### Activitatea echipei AOȘR Teams -Etapa 3/2023

| Nume, funcție                  | Activități                               | Semnătura |
|--------------------------------|--|-----------|
| Gradisteanu Grațiela, director | Secvențiere Ion Torrent<br>Real Time PCR |           |

|                           |   |   |
|---------------------------|---|---|
| Barbu Ilda, membru        | Analiza bioinformatică -QIIME,<br>index Shannon<br>Analiza statistica |  |
| Grigore Georgiana, membru | Extracție ADN<br>Analiza datelor experimentale                        |  |