

**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, E-mail: 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

Membri echipă proiect

CS II Dr. Grațiana Grădișteanu – director

Lect. Univ.Dr. Ilda Barbu – membru

Drd. Georgiana Grigore

Introducere

Descifrarea mecanismelor patologice care stau la baza infecției cu SARS-CoV-2 (COVID-19) este o prioritară pentru practica clinică și sănătatea publică. Formele severe de COVID-19 sunt asociate cu un răspuns imun exagerat care poate declanșa insuficiență sistemică de organ [1]. O manifestare clinică gravă a COVID-19 este pneumonia și progresia către sindromul de detresă respiratorie acută (ARDS), aceasta întâlnindu-se în special la pacienții vârstnici, imunocompromiși [2].

SARS-Cov-2 provoacă în principal infecție pulmonară prin legarea de receptorii ACE2 ai celulelor epiteliale alveolare. Interesant, ARN-ul SARS-CoV-2 a fost găsit în fecalele pacienților infectați, sugerând o legătură subtilă între plămân și intestine [3]. S-a raportat că microbiota are un impact asupra sănătății pulmonare prin comunicarea bidirecțională dintre microbiota intestinală și plămâni, denumită adesea „axa intestin-plămân” [4]. Într-adevăr, mai multe studii au raportat o interacțiune între SARS-Cov2 și microbiota intestinală [5, 6]. Modificări ale semnăturilor microbiomului intestinal sunt raportate pentru pacienții cu COVID-19, în special la pacienții tratați cu antibiotice în timpul spitalizării [6, 7]. Chiar și în infecțiile ușoare, simptomele gastrointestinale sunt frecvent raportate la pacienții COVID-19. Numeroase studii au raportat ca pacienții cu COVID-19 prezintă modificări ale microbiotei intestinale în timpul spitalizării [8-10], iar aceste modificări de microbiota persistă la pacienții cu complicații pe termen lung de la COVID-19 [11, 12].

Diversitatea microbiotei intestinale și prezența microorganismelor pot avea un rol important în determinarea cursului COVID-19. Pacienții vârstnici, imunocompromiși, precum și pacienții cu alte comorbidități, cum ar fi tulburările cardiovasculare și diabetul de tip 2 (DZ2), sunt mai puțin eficienți în combaterea infecției cu SARS-CoV-2 [13, 14].

Scopul acestui proiect este de a investiga modificările microbiomului declanșate de COVID-19 într-o cohortă de pacienți cu DZII în comparație cu martorii sănătoși în vederea design-ului unui panel de markeri de microbiom și profil inflamator pentru prognosticul și tratamentul personalizat al pacienților diabetici post COVID-19 (Figura 1). Noutatea abordării constă în dezvoltarea unui instrument inovator de prognostic clinic care ar putea fi utilizat pentru alte boli inflamatorii sau alte infecții virale.

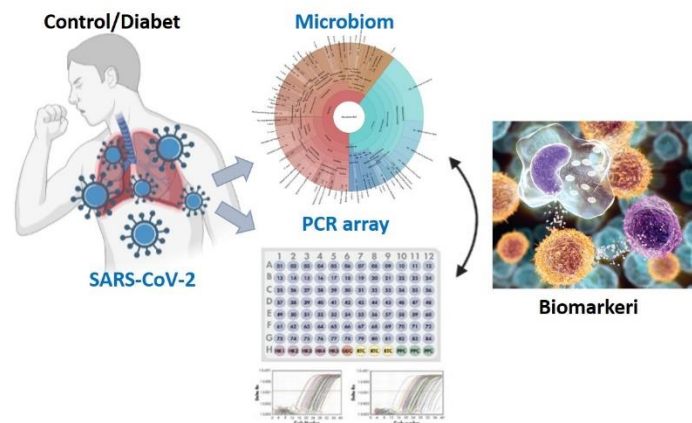


Figura 1 . Scopul proiectului

Etapa 1 de implementare a proiectului

În cadrul celei de a doua etape de implementare a proiectului (August -Decembrie 2022) s-au realizat următoarele activități: Analiza microbiotei bazată pe secvențiere de ultima generație pentru stabilirea profilurilor specifice la pacienții diabetici post COVID-19, Evaluarea profilului inflamator la pacienții diabetici după COVID-19, Investigarea inter-relației microbiom-inflamație, Corelarea microbiotei intestinale și respiratorii cu modificările statutului inflamator pentru a propune un panel pentru predicția severității COVID-19 la pacienții diabetici

Participanții incluși în studiu analizați a fost reprezentați de grupul de pacienți diabetici (n=15), recrutați la Institutul Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice "N.C. Paulescu" și respectiv grupul control de indivizi sănătoși (n=15). Pentru toți participanții la studiu s-a obținut consimțământul informat, formular aprobat de comisia de etică a Institutului de Cercetări al Universității din București (CEC/ 57/06.09.2021). Diagnosticul SARS-CoV-2 a fost realizat prin Real Time PCR pe baza kitului Genesis® COVID-19 2G (PRIMER DESIGN, UK). Extracția ADN-ului din probe de scaun (200 mg probă) s-a realizat pe baza kitului QiaAmp Mini Stool Kit (Qiagen) conform instrucțiunilor producătorului

Analiza microbiotei la pacienții diabetici după COVID-19 a fost realizat folosind **secvențiere de ultima generație** (*Next Generation Sequencing*). Pașii de lucru sunt prezentați în **Figura nr 2**. Secvențele ARNr 16S au fost amplificate din ADN-ul extras de la pacienti (probe de scaun) folosind perechi de primeri care sunt specifice pentru regiunea hipervariabilă V3- V4 a genei ARNr 16S. Produsele PCR derivate din amplificarea regiunilor hipervariabile ale genei ARNr 16S specifice au fost purificate prin separare electroforetică urmată de de purificare cu bile magnetice (AmPure XP BeckmanCoulter). Secvențierea bibliotecilor de ampliconi a fost efectuată pe un cip 318 utilizând sistemul Ion Torrent PGM și kitul Ion Sequencing 400 urmând instrucțiunile producătorului. Analiza secvențelor obținute a fost realizată prin intermediul software-ului Ion Reporter. Datele de secvențiere obținute au fost procesate folosind pipeline-ul Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) și pentru a calcula măsurile de diversitate, unitățile taxonomice operaționale 16S rRNA au fost definite la $\geq 97\%$ omologie de secvență.

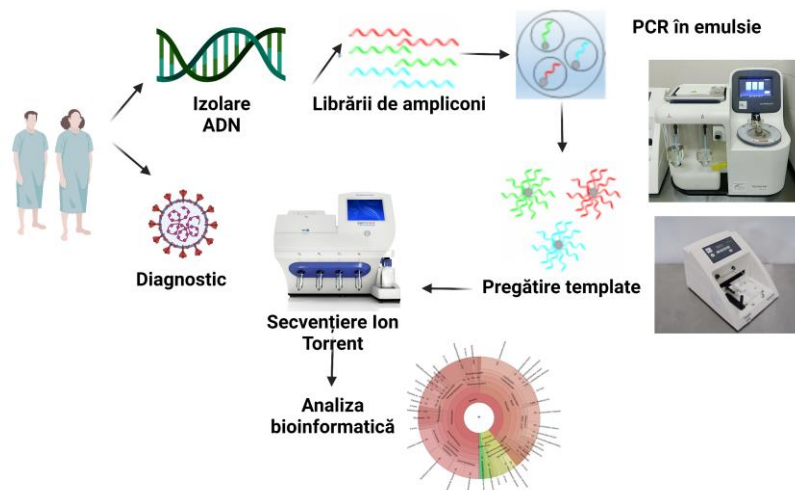


Figura 2. Pași de lucru- Obiectiv 1 -Analiza microbiomului post-SARS-CoV-2

Rezultate obținute

În această primă etapă a proiectului AOȘR Teams am analizat un număr de 30 de pacienți post infecție acută SARS-CoV-2- dintre care 15 au fost indivizi diabetici (cod T2D-diabet zaharat tip 2) și 15 indivizi au fost voluntary sănătoși (cod Control). Analiza Real Time PCR a arătat că nivelul de ARN viral (gena ORF1ab a virusului SARS-CoV-2) a fost similar între cele două grupuri experimentale (Figura 3a). Chiar dacă nu au fost găsite diferențe semnificative în cazul nivelurilor de proteină C reactivă (Figura 3b), pacienții diabetici au prezentat niveluri crescute ale citokinei proinflamatorii IL-8 (Figura 3c). În ceea ce privește nivelurile IL-1 β , pacienții cu DZII au avut tendința de a arăta niveluri mai mari, dar acestea nu au fost semnificative statistic (Figura 3d). Mai mult, expresia genei pro-inflamatorii IL-17 a fost semnificativ mai mare pentru grupul T2D (Figura 3e). În continuare, cuantificarea nivelurilor de oxid nitric nu a evidențiat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri testate (Figura 3f).

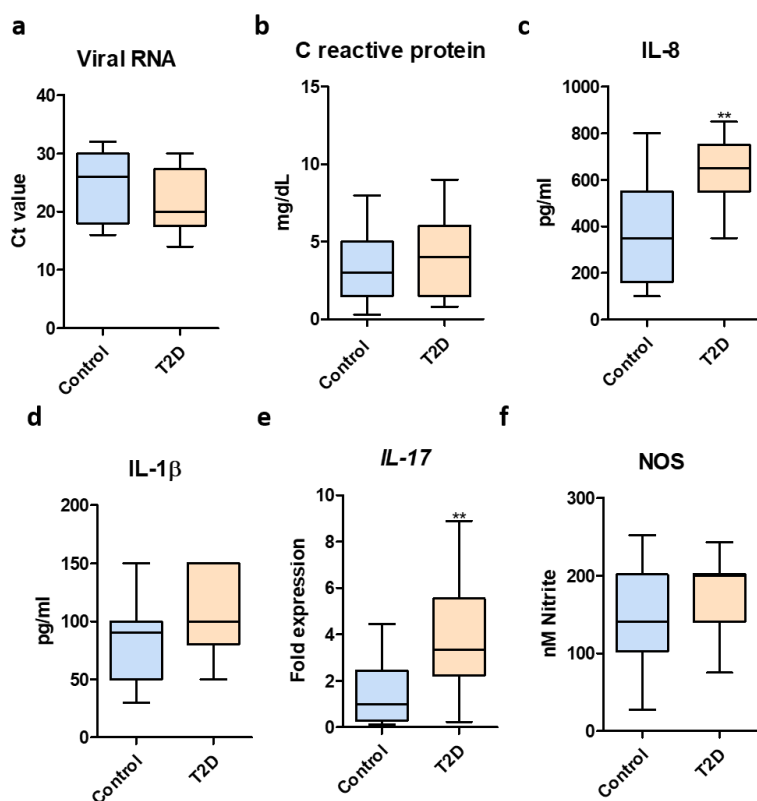


Figura 3. Markeri inflamatori în T2D după infecția cu SARS-CoV-2. a. Nivelurile de ARN SARS-CoV-2 la martorii sănătoși și la pacienții cu T2D - determinate folosind RT PCR; b. Cuantificarea proteinei C reactive în probe de ser de la martori sănătoși și diabetici infectați cu SARS-CoV-2; c. Cuantificarea IL-8 în probe de ser de la martori sănătoși și pacienți cu T2D infectați cu SARS-CoV-2; d. IL-1 β în probe de ser de la martori sănătoși și diabetici infectați cu SARS-CoV-2; e. Expresia IL-17 în probe de la martori sănătoși infectați cu SARS-CoV-2 și pacienți cu T2D; f. Cuantificarea NOS în probe de ser de la martori sănătoși și diabetici infectați cu SARS-CoV-2;

Analiza microbiomului intestinal pentru cei 30 de subiecți a arătat faptul că infecția SARS-CoV-2 modifică semnificativ α diversitatea microbiomului (Figura 4 a) indiferent de prezența diabetului zaharat de tip 2. Indexul Shannon ce cuantifică abundența și tipul de microorganisme la nivel individual a fost diminuat în urma infecției SARS-CoV-2 atât în cazul indivizilor diabetici cât și în cazul celor fără comorbidități. Analiza comparativă a indicilor Shannon a demonstrat cea mai redusă diversitate a microbiomului pentru indivizii diabetici, post COVID-19. Cuantificarea butiratului, un de acid gras cu lanț scurt important în reglarea homeostaziei intestinale, a arătat că pacienții diabetici aveau nivele scăzute de butirat chiar înainte de infecția SARS-CoV-2, aceste nivele fiind scăzute și mai mult ca urmare a infecției cu SARS-CoV-2. De asemenea, nivelurile de butirat au fost modificate semnificativ de infecția cu SARS-CoV-2 și în grupul de control sănătos (Figura 4b).

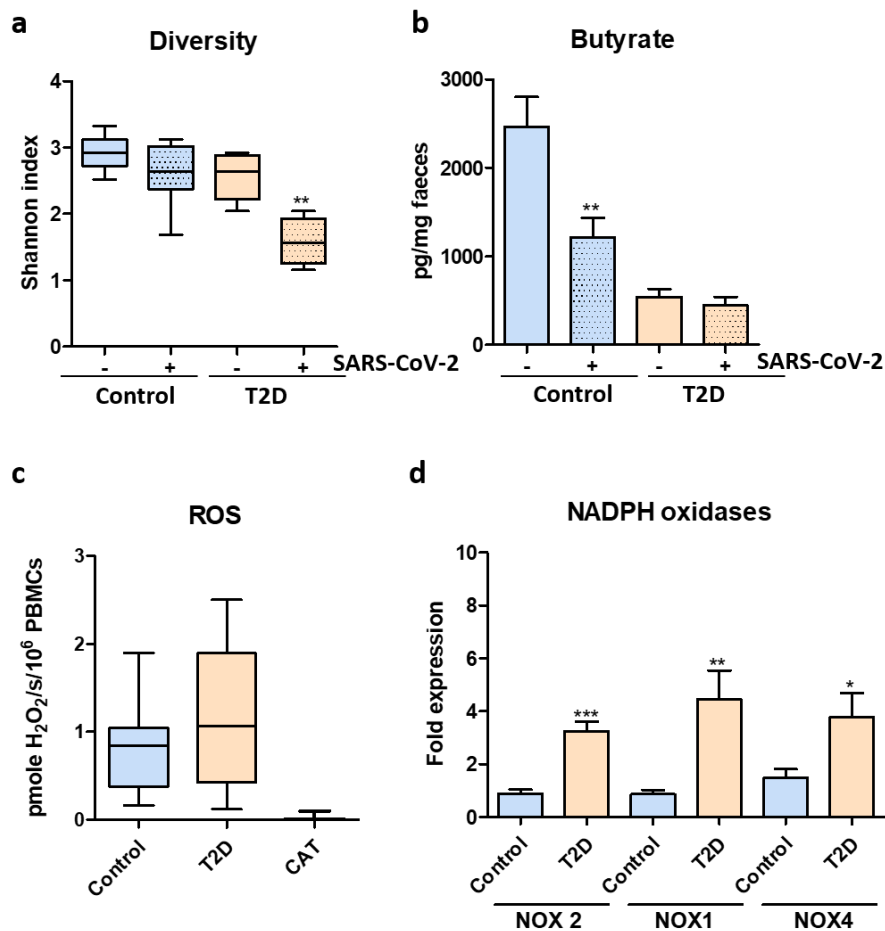


Figura 4. Modificari de microbiota si stress oxidativ in urma infectiei SARS-coV-2. a- diversitate microbiome (indice Shannon), b. nivele de butirata re si post COVID; c- Detectie peroxid de hidrogen din PBMC uri izoalte de la pacienti diabetic si indivizi control; d. Expresia nADPH oxidazelor NOX1, NOX2, NOX4- detectie prin Real Time PCR (Sonde Taqman).

Celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC) izolate de la martorii sănătoși infectați și de la pacienții cu DZII au produs niveluri mai mari de peroxid de hidrogen, așa cum reiese din rezultatele testului Amplex Red (Figura 4c). Producția crescută de specii reactive de oxigen a fost corelată cu o expresie semnificativ mai mare a NADPH oxidazelor producătoare de ROS Nox1, Nox2 și Nox 4 în cazul pacienților diabetici infectați cu SARS-CoV-2 (Figura 4d).

În urma analizei comparative a microbiomului asociat diabetului zaharat de tip 2 post infecție acută SARS-CoV-2 cu microbiomul indivizilor sănătoși post-infecție acută SARS-CoV-2 am identificat familia Enterobacteriaceae ca și populație microbială semnificativ diferită între cele două grupuri experimentale. Familia *Enterobacteriaceae* cuprinde microorganismele facultativ anaerobe și este frecvent asociată cu afecțiuni precum colita ulcerativă, boala Crohn și cancerul colorectal, fiind considerată marker al disbiozei intestinale (Figura 5a). Familia Sutterelaceae a fost de asemenea identificată a fi predominantă în microbiomul diabeticii infectați iar nivelele acesteia au fost crescute o dată cu infecția SARS-CoV-2 (Figura 5b).

În cazul indivizilor sănătoși din punct de vedere clinic, SARS-CoV-2 a dus la unele modificări de microbiome caracterizate de scăderea abundenței de microorganisme benefice precum *Faecalibacterium prausnitzii* (Figura 5c). In cazul altor tipuri de microorganism (de ex. *Bacteroides*), nu au fost identificate modificari in urma infectiei cu SARS-CoV-2 (Figura 5d).

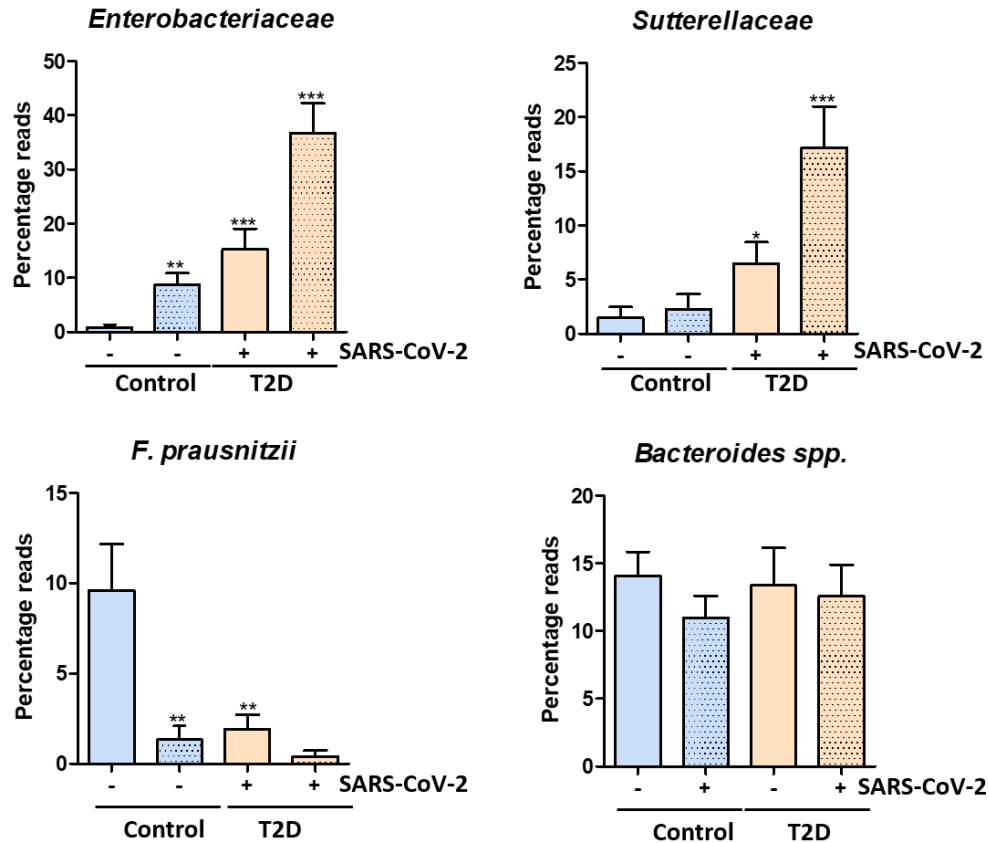


Figura 5. Disbioza intestinală post- infecție acută SARS-CoV-2 la indivizii diabetici. Abundența microbiană exprimată ca număr de read-uri secvențiere raportat la numărul total de read-uri per probă;

Studiile de specialitate relevă faptul că abundența ridicată de Enterobacteriaceae este deseori asociată cu modificarea microbiomului intestinal. Astfel, mediul intestinal pro-inflamator asociat abundenței crescute de *Enterobacteriaceae* poate favoriza expansiunea fungilor intestinali. Pentru a testa această ipoteză, am analizat abundența relativă a *Candida spp.* și *Aspergillus spp.* în cazul indivizilor diabetici și al indivizilor control post COVID-19. Într-adevăr, indivizii cu diabet zaharat de tip 2 prezintă la nivel intestinal nivele semnificativ crescute de specii de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Debaryomyces* și *Candida* (Figura 6) comparativ cu indivizii control, fără comorbidități.

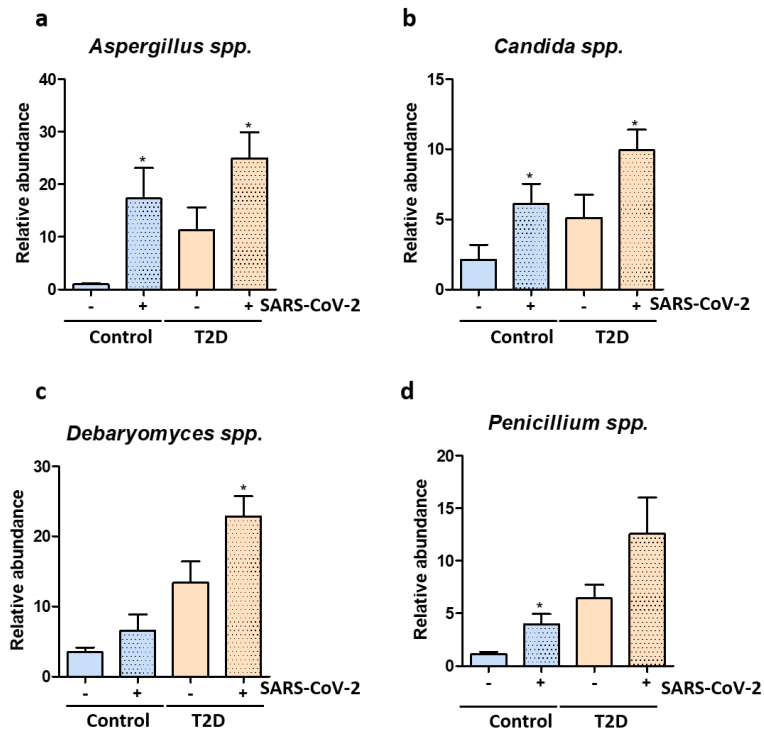


Figura 6. Modificările de microbiom induse de SARS-CoV-2, detectate prin RT-PCR

De asemenea, am corelat principalii taxoni identificați cu parametrii clinici ai pacientului, inclusiv încărcatură virală, stresul oxidativ (ROS, NOS), exprimarea NADPH oxidazei, IL-8, IL-1 β , IL-17, proteina C reactivă și butiric. Corelațiile Spearman au evidențiat asociații semnificative între încărcătura virală și *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Rickenellaceae* (**** $p < 0,0001$), *Porphyromonadaceae* (**** $p < 0,0001$), *Parasutterella* (**** $p < 0,0001$) și *Alistipes*. Au fost identificate corelații negative între nivelurile de ARN viral și microbiom pentru *Ruminococcaceae* (**** $p < 0,0001$), *Faecalibacterium* (**** $p < 0,0001$), *Lachnospiraceae* (**** $p < 0,0001$), *Bifidobacteriaceae* și *Eubacteriaceae* (** $p < 0,0001$). Nivelurile de specii reactive de oxigen (ROS) au fost corelate pozitiv cu *Enterobacteriaceae* (** $p = 0,0019$), *Bacteroidaceae* (** $p = 0,0001$) și *Faecalibacterium* (** $p = 0,0017$). Nivelurile de IL-8 au fost asociate pozitiv cu *Enterobacteriaceae* (* $p = 0,0331$), *Sutterella* (* $p = 0,0289$), *Bacteroidaceae* (** $p = 0,0002$), *Clostridiaceae* (** $p = 0,0019$) și *Parasutterella* (** $p = 0,0024$).

IL-1 β a fost corelată negativ cu *Lachnospiraceae* (**** $p < 0,0001$). În schimb, familiile *Enterobacteriaceae* (** $p = 0,0022$), și *Sutterellaceae* (* $p = 0,0476$) au fost asociate pozitiv cu IL-1 β . Expresia IL-17 a fost corelată pozitiv cu *Sutterellaceae* (** $p = 0,0007$), *Alistipes* (** $p = 0,0002$) și *Enterobacteriaceae* (**** $p < 0,0001$). Expresia NADPH oxidazelor Nox2 a fost corelată pozitiv cu *Enterobacteriaceae* (**** $p < 0,0001$), *Rickenellaceae* (** $p = 0,0002$) și *Sutterella* (** $p = 0,0037$). Expresia Nox1 a fost corelată pozitiv cu *Enterobacteriaceae* și negativ cu *Lachnospiraceae* și *Faecalibacterium*. Expresia Nox4 a fost asociată pozitiv cu *Bacteroidaceae* și asociată negativ cu

Lachnospiraceae. Am identificat corelații pozitive între proteina C reactivă și mai mulți membri ai microbiotei, inclusiv *Enterobacteriaceae*, *Alistipes*, *Sutterella* și *Bacteroidaceae*. Nu am găsit corelații semnificative statistic între nivelurile NOS și principalele membri ai microbiotei (Figura 7).

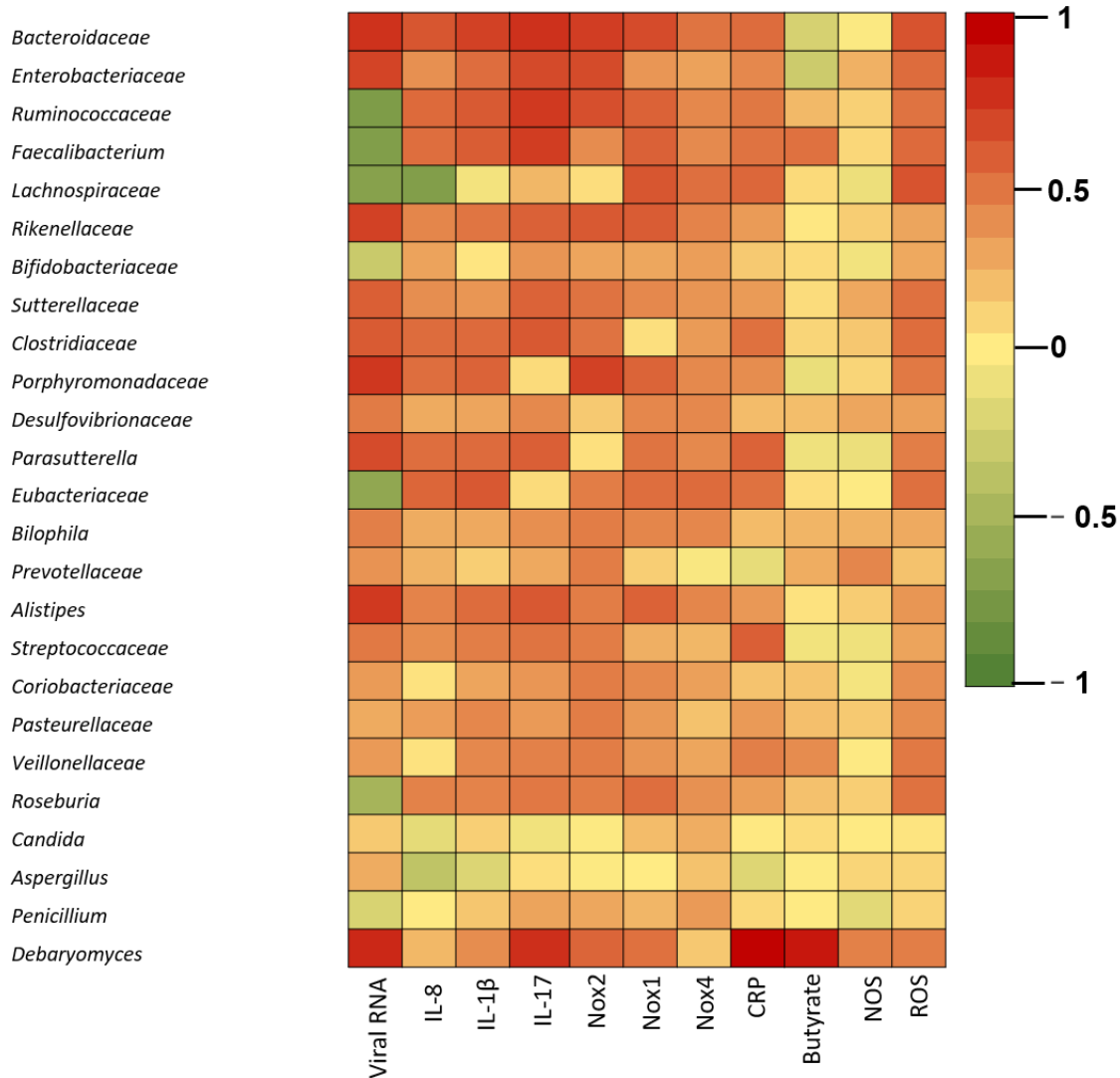


Figura 7. Corelatii Spearman microbiota- parametri clinici la pacienti diabetic si indivizi sanatosi, post infectie acuta SARS-CoV-2



Concluzii

Proiectul AOSR Teams ne-a oferit oportunitatea de a analiza secventiere d eultima generatie modificarile de microbiota induse de infectia SARs-CoV-2 la indivizi diabetici in comparatie cu indivizii sanatosi. Am identificat microorganisme precum *Enterobacteriaceae*, *Sutterelaceae* si *F. prausnitzii* ca fiind afectate de infectia SARS-CoV-2. Am realizat corelatii statistice intre patternurile de microbiota idenficate si parametrii clinici ai pacientilor. Rezultatele obtinute au fost trimise catre publicare in revista Biomedicines, factor d eimpact 4,75 pe data de 3.12.2022.

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** - 41st 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- Grațela GRĂDIȘTEANU PÎRCĂLĂBIORU, Ilda BARBU, Irina GHEORGHE-BARBU, Georgiana GRIGORE, Octavian SAVU, Mariana-Carmen CHIFIRIUC
3. **Articol** 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**, *23*, (acceptat 27.11.2022, in curs de publicare)

Articol ISI in evaluare:


 **biomedicines** 

Article

Impact of COVID-19 on the microbiome and inflammatory status of type 2 diabetes patients

Gratiela Gradisteanu Pircalabioru^{1,2,*}, Georgiana Alexandra Grigore^{2,3}, Ilda Czobor Barbu^{2,3}, Mariana-Carmen Chifiriuc^{1,2,3,4}, Octavian Savu^{5,6}

¹ Research Institute of University of Bucharest (ICUB), 050095 Bucharest, Romania; gratiela.gradisteanu@icub.unibuc.ro
² Academy of Romanian Scientists, 050045 Bucharest, Romania
grigore.georgiana-alexandra@s.bio.unibuc.ro, ilda.barbu@bio.unibuc.ro
³ Romanian Academy, 010071 Bucharest, Romania; carmen.chifiriuc@bio.unibuc.ro
⁴ Faculty of Biology, University of Bucharest, 050095 Bucharest, Romania;
⁵ “N.C. Paulescu” National Institute of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, 020042 Bucharest, Romania; octavian.savu@umfcd.ro
⁶ Department of Doctoral School, “Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, 5th District, 050474 Bucharest, Romania
* Correspondence: gratiela.gradisteanu@icub.unibuc.ro

 **Editorial Office** <biomedicines@mdpi.com>
cătore eu, Georgiana, Ilda, Mariana-Carmen, Octavian ▾

engleză ▾ > română ▾ [Tradu mesajul](#)

Dear Dr. Gradisteanu Pircalabioru,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Biomedicines
Manuscript ID: biomedicines-2107594
Type of manuscript: Article
Title: Impact of COVID-19 on the microbiome and inflammatory status of type 2 diabetes patients
Authors: Gratiela Gradisteanu Pircalabioru *, Georgiana Alexandra Grigore, Ilda Czobor Barbu, Mariana-Carmen Carmen Chifiriuc, Octavian Savu
Received: 3 December 2022
E-mails: gratiela.gradisteanu@icub.unibuc.ro, grigore.georgiana-alexandra@s.bio.unibuc.ro, ilda.barbu@bio.unibuc.ro, carmen.chifiriuc@bio.unibuc.ro, savu.octavian@gmail.com
Submitted to section: Microbiology in Human Health and Disease,

Referințe bibliografice

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Chan, J.F.; Yuan, S.; Kok, K.H.; To, K.K.; Chu, H.; Yang, J. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. **2020**;395(10223):514–523. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9
6. 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.
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. Gu, S; Chen, Y.; Wu, Z.; Chen, Y.; Gao, H.; Lv, L. et al. Alterations of the gut microbiota in patients with coronavirus disease 2019 or H1N1 influenza. *Clin. Infect. Dis*. **2020**;71:2669–2678. doi: 10.1093/cid/ciaa709.
10. Liu, Q.; Mak, J.W.Y.; Su, Q.; Yeoh, Y.K.; Lui, G.C.; Ng, S.S.S, et al. Gut microbiota dynamics in a prospective cohort of patients with post-acute COVID-19 syndrome. *Gut*. **2022**;71:544–552. doi: 10.1136/gutjnl-2021-325989.
11. Zhang, F.; Wan, Y.; Zuo, T.; Yeoh, Y.K.; Liu, Q.; Zhang, L. et al. Prolonged impairment of short-chain fatty acid and L-isoleucine biosynthesis in gut microbiome in patients with COVID-19. *Gastroenterology*. **2022**;162:548–561.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2021.10.013.
12. Vestad, B.; Ueland, T.; Lerum, T.V.; Dahl, T.B.; Holm, K.; Barratt-Due, A, et al. Respiratory dysfunction three months after severe COVID-19 is associated with gut microbiota alterations. *J. Intern. Med*. **2022** doi: 10.1111/joim.13458.
13. 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.
14. 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

15. Darif, D.; Hammi, I.; Kihel, A.; El Idrissi Saik, I.; Guessous, F.; Akarid, K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microb Pathog.* **2021** Apr;153:104799. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104799