

Agata Stepuch, Daria Fabisiak

ALTERATIONS IN HUMAN INTESTINAL MICROBIOTA IN THE COURSE OF SARS-COV-2 VIRUS INFECTION

ZMIANY MIKROBIOTY JELITOWEJ CZŁOWIEKA W PRZEBIEGU ZAKAŻENIA WIRUSEM SARS-COV-2

Department of Bacteriology and Biocontamination Control,
National Institute of Public Health NIH – National Research Institute in Warsaw
Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH –
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

ABSTRACT

There is an interaction between the bacteria and the host at the genetic, metabolic and immunological levels. The intestine is the largest immune organ in the human's body, and the microbes present in it influence the immune response. An imbalance in the type and the number of bacteria can affect human health. The study attempts to review the current reports on intestinal dysbiosis in the course of SARS-CoV-2 infection and the impact of the composition of the intestinal microbiome on the course and severity of COVID-19 disease.

Key words: *gut microbiota, microbiome, dysbiosis, COVID-19, SARS-CoV-2 virus*

STRESZCZENIE

Pomiędzy bakteriami a gospodarzem zachodzi ciągła interakcja na poziomach: genetycznym, metabolicznym i immunologicznym. Jelito jest największym organem immunologicznym w organizmie człowieka, a obecne w nim drobnoustroje wpływają na odpowiedź immunologiczną. Brak równowagi w rodzaju i liczbie bakterii może mieć wpływ na stan zdrowia człowieka. W pracy podjęto próbę przeglądu aktualnych doniesień na temat dysbiozy jelitowej w przebiegu zakażenia wirusem SARS-CoV-2 oraz wpływu składu mikrobiomu jelitowego na przebieg i nasilenie choroby COVID-19.

Słowa kluczowe: *mikrobiota jelitowa, mikrobiom, dysbioza, COVID-19, wirus SARS-CoV-2*

HUMAN INTESTINE MICROBIOTE

The human digestive system is the environment of a huge number of microorganisms. The intestinal microbiota consists of over a thousand species of bacteria. In an adult human, the bacterial composition of the intestinal microbiota consists mainly of anaerobes, which are more than 100 times more numerous than facultative aerobic bacteria (1). In addition to bacteria, the intestinal microbiota includes other microorganisms: archaea, viruses and eukaryotic organisms (2).

The factors influencing the formation of the microbiota include genetic factors, type of delivery, sex, age, environmental conditions and the diet used (1, 3). Changes in the composition and diversity of the

MIKROBIOTA JELITOWA CZŁOWIEKA

Przewód pokarmowy człowieka jest środowiskiem występowania ogromnej liczby drobnoustrojów. Mikrobiotę jelitową tworzy ponad tysiąc gatunków bakterii. U dorosłego człowieka bakteryjny skład jelitowej mikrobioty stanowią głównie beztlenowce, które swą liczbą przewyższają ponad 100-krotnie bakterie fakultatywnie tlenowe (1). Oprócz bakterii w skład mikrobioty jelitowej wchodzi inne mikroorganizmy: archeony, wirusy i organizmy eukariotyczne (2).

Do czynników mających wpływ na kształtowanie mikrobioty zalicza się: czynniki genetyczne, typ porodu, płeć, wiek, warunki środowiskowe i stosowaną dietę (1, 3). Zmiany w składzie i różnorodności mi-

microbiota are mainly observed in the early stages of life and in old age. In the remaining stages of human life, the microbiota undergoes slight modifications (3).

Two types of bacteria definitely dominate in the human intestines: *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, followed by the types: *Proteobacteria* and *Actinobacteria*. The share of other taxonomic groups is variable and includes bacteria of the *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, and *Verrucomicrobia* types (3).

In 2020, Radjabzadeh et al. published the results of a research paper on the analysis of the composition of the gut microbiota of children and adults. The research was conducted on the Dutch population in 1,427 adults (46-88 years old) and 2,111 children (9-12 years old). In the studied adults, the following results were obtained for individual types of bacteria: *Firmicutes* 75%, *Bacteroidetes* 13%, *Proteobacteria* 5%, *Actinobacteria* 4%, *Verrucomicrobia* 1%, other types 2% (Fig. 1). The results in children showed differences compared to adults in the types of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. The *Bacteroidetes* type in children accounted for 30%, and the *Firmicutes* type for 57%. The authors indicate that in both studied populations (children and adults), the largest number of bacterial species belonged to the *Firmicutes* type (4).

krobioty obserwuje się głównie w początkowych etapach życia oraz w wieku podeszłym. W pozostałych etapach życia człowieka mikrobiota ulega niewielkim modyfikacjom (3).

W ludzkich jelitach zdecydowanie dominują dwa typy bakterii: *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, a w dalszej kolejności typy: *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Udział innych grup taksonomicznych jest zmienny i obejmuje bakterie typów: *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia* (3).

Radjabzadeh i wsp. w 2020 roku opublikowali wyniki pracy badawczej dotyczącej analizy składu mikrobioty jelitowej dzieci i dorosłych. Badania zostały przeprowadzone na populacji holenderskiej u 1 427 dorosłych (46-88 lat) oraz 2 111 dzieci (9-12 lat). U badanych dorosłych uzyskano następujące wyniki dla poszczególnych typów bakterii: *Firmicutes* 75%, *Bacteroidetes* 13%, *Proteobacteria* 5%, *Actinobacteria* 4%, *Verrucomicrobia* 1%, inne typy 2% (Ryc. 1). Wyniki badań u dzieci wykazały różnice w stosunku do osób dorosłych w zakresie typów *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Typ *Bacteroidetes* u dzieci stanowił 30%, a typ *Firmicutes* 57%. Autorzy wskazują, że w obu badanych populacjach (dzieci i dorosłych) najwięcej gatunków bakteryjnych należało do typu *Firmicutes* (4).

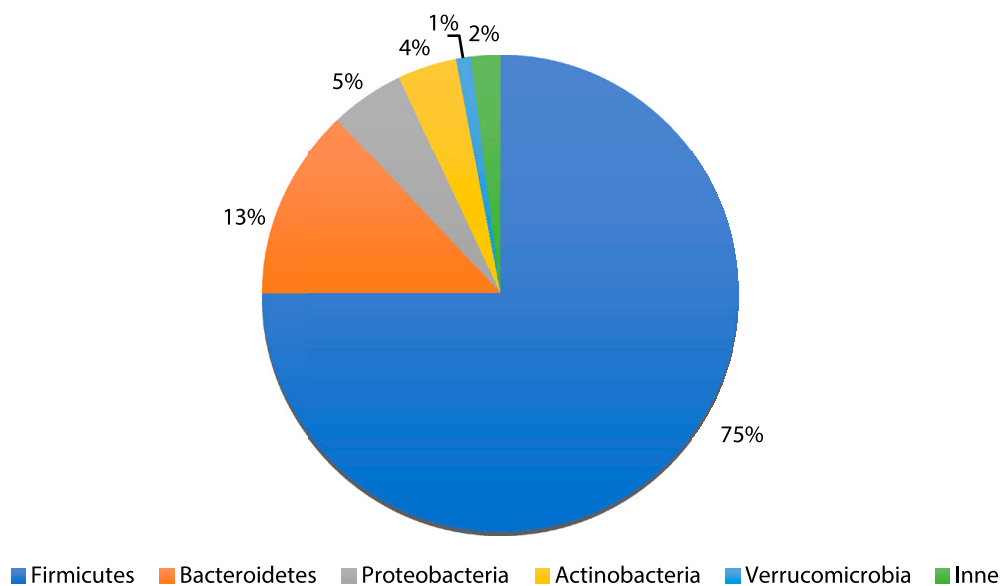


Figure 1. Percentage share of particular types of bacteria in the intestinal microbiota. Chart based on research conducted on a Dutch population of 1,427 adults (4).

Rycina 1. Procentowy udział poszczególnych typów bakterii w mikrobiocie jelitowej. Wykres opracowany na podstawie badań przeprowadzonych na populacji holenderskiej liczącej 1 427 dorosłych osób (4).

The intestinal microbiota forms a comprehensive and metabolically active ecosystem. Factors influencing the composition of the microbiota include, among others: diet, medications and severe stress (2). Dysbiosis occurs in the course of many diseases such as diabetes, obesity, autoimmune diseases and gastrointestinal diseases (irritable bowel syndrome, inflammatory bowel

Mikrobiota jelitowa tworzy kompleksowy i aktywny metabolicznie ekosystem. Do czynników mających wpływ na skład mikrobioty należą m.in.: dieta, leki i silny stres (2). Dysbioza występuje w przebiegu wielu chorób takich jak: cukrzyca, otyłość, choroby autoimmunologiczne i choroby przewodu pokarmowego (zespół jelita drażliwego, zapalne choroby jelit, biegunka

diseases, *Clostridioides difficile* diarrhea, colorectal cancer, gastric cancer, inflammatory diseases of the oral cavity and periodontium) (5, 6).

An important aspect of the research is the analysis of the correlation between changes in the intestinal microbiota and changes in human health. The cultivation of microorganisms and their phenotypic identification are classic methods of studying microorganisms inhabiting the human body. However, it is estimated that even 20-80% of microorganisms living in the human body cannot be grown under laboratory conditions. The development of molecular biology techniques allowed for a broader analysis of the microbiota (7, 8).

Metagenomics, i.e. the analysis of the genome of a population of microorganisms, enables the exact genetic characterization of microbiota without the need to cultivate them based on classical methods. The analysis of the microbiome is currently performed based on metagenomic sequencing – one region of the sequence (16SrRNA) or full-genomic sequencing.

Sequence analysis of the genes encoding the 16SrRNA variable regions enables detection and identification of microorganisms, usually down to the genus level. An alternative approach to the 16SrRNA amplicon sequencing method is whole-genome sequencing (WGS). WGS analysis shows the differences at the nucleotide level, which allows the exact identification of the microorganism and the determination of differences between strains of the same species or genus. New DNA sequencing technologies are constantly being developed. The amount of research on the microbiome has grown rapidly since its use in next-generation sequencing (NGS) research, which makes it possible to read millions of sequences in a single experiment (3, 7, 9, 10).

DISORDERS OF THE INTESTINAL MICROBIOTE IN THE COURSE OF INFECTION WITH SARS-COV-2 VIRUS

This article uses a selection of literature including original research articles and review articles. So far, there have been few studies on the analysis of the composition of the gut microbiota in the course of COVID-19.

The most common symptoms in COVID-19 patients are cough, fever, and dyspnoea. Other symptoms include weakness, malaise, headache, muscle pain, sore throat, loss of taste and/or smell (11). Gastrointestinal symptoms are not typical, however, early reports from Wuhan showed that 2% to 10% of COVID-19 patients had gastrointestinal (GI) symptoms, including diarrhea (18), and, according to a later meta-analysis, gastrointestinal symptoms occurred in up to 20% of patients (12, 13).

o etiologii *Clostridioides difficile*, rak jelita grubego, rak żołądka, choroby zapalne jamy ustnej i przyzębia) (5, 6).

Ważnym aspektem badań pozostaje analiza korelacji zmian mikrobioty jelitowej ze zmianami stanu zdrowia człowieka. Hodowla drobnoustrojów i ich fenotypowa identyfikacja to klasyczne metody badania mikroorganizmów zasiedlających ciało człowieka. Jednak szacuje się, że nawet 20-80% mikroorganizmów bytujących w ludzkim organizmie nie udaje się wyhodować w warunkach laboratoryjnych. Rozwój technik biologii molekularnej umożliwił szerszą analizę mikrobioty (7, 8).

Metagenomika, czyli analiza genomu populacji mikroorganizmów, umożliwia dokładną charakterystykę mikrobioty pod względem genetycznym, bez konieczności ich hodowli w oparciu o klasyczne metody. Analiza mikrobiomu obecnie jest dokonywana w oparciu o sekwencjonowanie metagenomowe – jednego regionu sekwencji (16SrRNA) lub pełnogenomowe. Analiza sekwencji genów kodujących regiony zmienne 16SrRNA umożliwia wykrywanie i identyfikację drobnoustrojów zazwyczaj do poziomu rodzaju (9). Alternatywnym podejściem do metody sekwencjonowania ampliconu 16SrRNA jest sekwencjonowanie całego genomu (WGS, ang. whole-genome sequencing). Analiza WGS pokazuje różnice na poziomie nukleotydowym, co pozwala na dokładną identyfikację mikroorganizmu oraz określenie różnic pomiędzy szczepami tego samego gatunku lub rodzaju. Nowe technologie sekwencjonowania DNA są stale rozwijane. Liczba badań dotyczących mikrobiomu gwałtownie wzrosła od czasu wykorzystania w badaniach sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. next-generation sequencing), które umożliwia odczytanie milionów sekwencji podczas jednego doświadczenia (3, 7, 9, 10).

ZABURZENIA MIKROBIOTY JELITOWEJ W PRZEBIEGU ZAKAŻENIA WIRUSEM SARS-COV-2

W niniejszym artykule wykorzystano wybór literatury obejmujący oryginalne artykuły badawcze oraz artykuły przeglądowe. Dotychczas powstały nieliczne prace badawcze dotyczące analizy składu mikrobioty jelitowej w przebiegu COVID-19.

Objawy najczęściej występujące u chorych z COVID-19 to kaszel, gorączka i duszność. Inne objawy to: osłabienie, złe samopoczucie, ból głowy, ból mięśni, ból gardła, utrata smaku i/lub węchu (11). Objawy ze strony układu pokarmowego nie należą do typowych, jednak wczesne doniesienia z Wuhan wykazały, że od 2% do 10% pacjentów z COVID-19 miało objawy żołądkowo-jelitowe (GI), w tym biegunkę (18), a według późniejszej metaanalizy objawy żołądkowo-jelitowe występowały nawet u 20% chorych (12, 13). W różnych pracach

In various studies describing the clinical course of COVID-19, the incidence of diarrhea in patients with confirmed SARS-CoV-2 infection ranged from 2% to 50% of cases. A pooled analysis showed that diarrhea occurred in 10.4% of patients with confirmed SARS-CoV-2 infection (12).

The SARS-CoV-2 virus enters human cells via the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor. ACE2 expression was demonstrated not only in second-order pneumocytes (alveolar epithelial cells), but also in the cells of the gastrointestinal mucosa, with predominant expression in enterocytes of the ileum and colon. As a result of damage to enterocytes, absorption mechanisms are likely to be impaired and consequently lead to diarrhea (13-15).

In a meta-analysis conducted by Cheung et al., the presence of the SARS-CoV-2 virus in rectal swabs and stool samples was confirmed in 48% of COVID-19 patients, suggesting that the gastrointestinal tract may be an extrapulmonary site of virus replication and activity (16). Virus RNA could be detected in stool samples even when respiratory samples were already negative (16, 17).

In 2020, Zuo et al. assessed changes in the gut microbiome in people with COVID-19 and the relationship of these changes with the severity of the disease and viral excretion in the faeces. The study analyzed the composition of the intestinal microbiome in 15 patients hospitalized due to COVID-19 (including 7 without antibiotic therapy) and in the control sample consisting of 15 healthy people (recruited from the general population, without medical history and no antibiotic therapy in the last 3 months) and 6 people hospitalized for CAP (Community-Acquired Pneumonia) treated with antibiotics. In the group of COVID-19 patients, 9 patients were diagnosed with pneumonia and fever (classified as moderate severity), one patient had no radiographic signs of pneumonia (mild severity of COVID-19), 3 patients' condition was classified as severe (respiratory rate ≥ 30 bpm or saturation $< 93\%$) and 2 patients' condition was assessed as critical (respiratory failure requiring mechanical ventilation, shock or organ failure requiring intensive care). Stool samples were collected 2 or 3 times a week from the beginning of hospitalization until discharge from hospital and then examined using metagenomic sequencing. Studies have shown disorders in the gut microbiota in people who have had COVID-19. Gut dysbiosis also persisted after the elimination of SARS-CoV-2 virus and the resolution of respiratory symptoms. The baseline stool microbiome of COVID-19 patients was compared with the control group, taking into account age, gender, antibiotic use and comorbidities. The analyzes showed that the composition of the gut microbiome in COVID-19

opisujących przebieg kliniczny COVID-19 częstość występowania biegunki u pacjentów z potwierdzonym zakażeniem SARS-CoV-2 wahała się od 2% do 50% przypadków. Analiza zbiorcza wykazała, że biegunka występowała u 10,4% pacjentów z potwierdzonym zakażeniem SARS-CoV-2 (12).

Wirus SARS-CoV-2 wnika do komórek człowieka za pośrednictwem receptora dla konwertazy angiotensyny 2 (ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2). Ekspresję ACE2 wykazano nie tylko w pneumocytach II rzędu (komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych), lecz także w komórkach błony śluzowej przewodu pokarmowego, z dominującą ekspresją w enterocytach jelita cienkiego i okrężnicy. W wyniku uszkodzenia enterocytów prawdopodobnie dochodzi do zaburzeń mechanizmów wchłaniania i w konsekwencji do biegunki (13-15).

W metaanalizie przeprowadzonej przez Cheunga i wsp. obecność wirusa SARS-CoV-2 w wymazach z odbytu i próbkach kału potwierdzono u 48% pacjentów z COVID-19, co sugeruje, że przewód pokarmowy może być pozapłucnym miejscem replikacji i aktywności wirusa (16). RNA wirusa można było wykryć w próbkach kału, nawet gdy próbki z dróg oddechowych dawały już wynik negatywny (16, 17).

Zuo i wsp. w 2020 roku dokonali oceny zmian w mikrobiomie jelitowym u osób chorych na COVID-19 oraz związku tych zmian z nasileniem choroby i wydalaniem wirusa z kałem. W badaniach analizowano skład mikrobiomu jelitowego u 15 pacjentów hospitalizowanych z powodu zachorowania na COVID-19 (w tym 7 osób bez terapii antybiotykowej) oraz w próbie kontrolnej, którą stanowiła 15 osobowa grupa osób zdrowych (rekrutowani z populacji ogólnej, bez wywiadu chorobowego i terapii antybiotykowej w ciągu ostatnich 3 miesięcy) i 6 osób hospitalizowanych z powodu pozaszpitalnego zapalenia płuc (CAP Community-Acquired Pneumonia), wszystkie osoby w tej grupie były leczone antybiotykami. W grupie pacjentów chorych na COVID-19 u 9 osób stwierdzono zapalenie płuc i gorączkę (stan określono jako umiarkowany), u jednej osoby nie stwierdzono radiologicznych cech zapalenia płuc (stan określony jako łagodny), u 3 osób określono stan jako ciężki (częstość oddechów ≥ 30 /min lub saturacja $< 93\%$), u 2 osób określono stan jako krytyczny (niewydolność oddechowa wymagająca wentylacji mechanicznej, wstrząs lub niewydolność narządów wymagająca intensywnej opieki). Próbkę kału pobierano 2 lub 3 razy w tygodniu od początku hospitalizacji do czasu wypisu ze szpitala, a następnie badano z zastosowaniem sekwencjonowania metagenomowego. Badania wykazały zaburzenia mikrobioty jelitowej u osób, które przeszły COVID-19. Dysbioza jelit utrzymywała się również po eliminacji wirusa SARS-CoV-2 i ustąpieniu objawów ze strony układu oddechowego. Porównano

patients differed significantly compared to the control group, whether or not they were treated with antibiotics. The factor affecting the gut microbiome most strongly was infection with the SARS-CoV-2 virus, followed by hyperlipidemia, pneumonia, and antibiotic therapy. Age and gender showed no significant effect. Dysbiosis was confirmed at the hospitalization stage of COVID-19 patients, as well as after hospitalization (18).

Table 1 shows the microbiota changes observed in the study in the course of COVID-19. The unfavorable changes consisted in enriching the microbiota with opportunistic pathogens: *Clostridium hathewayi*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides nordii*, and reducing the number of symbiotic commensals: *Eubacterium ventriosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia*, *Lachnospiraceae* (18).

Based on research conducted by Zuo et al. for three representatives of *Firmicutes* bacteria: *Coprobacillus* genus, *Clostridium ramosum*, *Clostridium hathewayi* species, of the baseline microbiome, a positive correlation with the severity of COVID-19 was confirmed. Such changes may be detrimental to the host, as both *Clostridium ramosum* and *Clostridium hathewayi* can cause infections in humans (18).

A genus *Clostridium* is a group of anaerobic bacteria widely distributed in nature, but also constituting the colon's microbiota. Since the development of molecular methods based on the sequence analysis of genes encoding the variable regions of the 16S rRNA gene, more than 150 species of the genus *Clostridium* have been described. Most are considered to be harmless

wyjściowy mikrobiom kału pacjentów z COVID-19 z grupą kontrolną z uwzględnieniem wieku, płci, stosowanych antybiotyków i chorób współwystępujących. Analizy wykazały, że skład mikrobiomu jelitowego u pacjentów z COVID-19 znacząco różni się w porównaniu z grupą kontrolną, niezależnie od tego, czy byli oni leczeni antybiotykami. Czynnikiem najsilniej wpływającym na mikrobiom jelit byłoby zakażenie wirusem SARS-CoV-2, w dalszej kolejności hiperlipidemia, zapalenie płuc, antybiotykoterapia. Wiek oraz płeć nie wykazały znaczącego wpływu. Dysbiozę potwierdzono na etapie hospitalizacji pacjentów z COVID-19, jak również po zakończeniu hospitalizacji (18).

Tabela 1 przedstawia obserwowane w badaniach zmiany mikrobioty w przebiegu COVID-19. Niekorzystne zmiany polegały na wzbogaceniu mikrobioty w patogeny oportunistyczne: *Clostridium hathewayi*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides nordii*, oraz zmniejszeniu liczby symbiotycznych komensali: *Eubacterium ventriosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia*, *Lachnospiraceae* (18). Na podstawie przeprowadzonych przez Zuo i wsp. badań dla trzech przedstawicieli bakterii typu *Firmicutes*: rodzaj *Coprobacillus*, gatunki: *Clostridium ramosum*, *Clostridium hathewayi*, obecnych wyjściowo w mikrobiomie pacjentów z COVID-19, potwierdzono pozytywną korelację z ciężkością przebiegu COVID-19. Zarówno *Clostridium ramosum*, jak i *Clostridium hathewayi* mogą wywoływać zakażenia u ludzi (18).

Table 1. Changes in the composition of the microbiota in the course of COVID-19, the data come from the research described in the text (18, 27).

Tabela 1. Zmiany składu mikrobioty w przebiegu COVID-19, dane pochodzą z prac badawczych opisanych w tekście (18, 27).

Type of bacteria	Representatives of individual types of bacteria	Increase (+) or decrease (-) in the number of bacteria
Firmicutes	<i>Clostridium hathewayi</i>	+
	<i>Clostridium ramosum</i>	+
	<i>Coprobacillus</i>	+
	<i>Eubacterium rectale</i>	-
	<i>Eubacterium ventriosum</i>	-
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	-
	<i>Lachnospiraceae</i>	-
	<i>Roseburia</i>	-
	<i>Ruminococcus gnavus</i>	+
	<i>Ruminococcus torques</i>	+
Bacteroidetes	<i>Bacteroides nordii</i>	+
	<i>Bacteroides dorei</i>	+
Actinobacteria	<i>Actinomyces viscosus</i>	+
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	-
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i>	+

saprophytes, but some species of these bacteria can cause enteritis and enterotoxaemia in humans (19).

Clostridium hathewayi was first described in 2001. This microbe was cultured in the laboratory from blood cultures of patients with appendicitis, cholecystitis and liver abscess (19-21).

Clostridium ramosum is a common intestinal anaerobe, but it can also rarely cause inner ear infections, bacteremia or abscesses (22). This microorganism can produce IgA1 and IgA2 proteases, which may facilitate the penetration of the intestinal mucosa and allow bacteria to escape the mucosal defence in particularly susceptible patients (23).

Coprobacillus, as mentioned above is a potential human pathogen, especially in patients with mechanical intestinal damage, at an increased risk of gastrointestinal infections. In 2020, the first case of bacteremia caused by *Coprobacillus cateniformis* was described (24).

In further studies of changes in the intestinal microbiome in the course of COVID-19, Zuo et al. confirmed the inverse correlation between the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* and *Alistipes onderdonkii* and the severity of COVID-19, i.e. the greater the number of these bacteria in the composition of the microbiota, the course of the disease was milder. It is worth mentioning the role played by these microorganisms – the decrease in the population of *Faecalibacterium prausnitzii* promotes inflammatory processes, while species of the genus *Alistipes* modulate immunity. The number of *Alistipes* bacteria positively correlates with the number of B-lymphocyte precursors (18).

Zuo's team also found that the abundance of *Bacteroides dorei*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides massiliensis* and *Bacteroides ovatus* species is inversely correlated with the number of SARS-CoV-2 virus copies in the faeces (18). Another relationship confirmed by the same team of researchers concerned the intestinal bacteria of the *Erysipelotrichaceae* family, belonging to the *Firmicutes* type. The greater the number of these bacteria in the composition of the patients' microbiota, the greater the number of SARS-CoV-2 viruses in the faeces (18). Bacteria of the *Erysipelotrichaceae* family are associated with gastrointestinal diseases (25).

The empirical use of antibiotics leads to further loss of symbiotic bacteria and exacerbation of intestinal dysbiosis in COVID-19 patients because antibiotics can eliminate beneficial bacteria and weaken the intestinal barrier (18, 26).

The results of studies by Zuo et al. suggest that the configuration of the host's gut microbiome may influence susceptibility and response to SARS-CoV-2 infection. The studies were performed on a small group of patients of Asian origin (18).

Rodzaj *Clostridium* to grupa bakterii beztlenowych szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie, ale również stanowiących mikrobiotę okrężnicy. Od czasu opracowania metod molekularnych, opartych na analizie sekwencji genów kodujących regiony zmienne genu 16SrRNA, opisano ponad 150 gatunków z rodzaju *Clostridium*. Większość uważana jest za nieszkodliwe saprofity, jednak niektóre gatunki tych bakterii mogą być przyczyną zapalenia jelit i enterotoksemii u ludzi (19).

Clostridium hathewayi został opisany po raz pierwszy w 2001 roku. Drobnoustrój ten wyhodowano w laboratorium z posiewów krwi chorych z zapaleniem wyrostka robaczkowego oraz zapaleniem pęcherzyka żółciowego i ropniem wątroby (19-21).

Clostridium ramosum jest powszechnie występującym beztlenowcem jelitowym, ale rzadko może być także przyczyną zakażenia ucha wewnętrznego, bakteriemii lub ropni (22). Drobnoustrój ten może wytwarzać proteazy immunoglobulin IgA1 i IgA2, co może ułatwiać penetrację błony śluzowej jelit i umożliwiać bakteriom ucieczkę przed obroną śluzówkową u szczególnie podatnych pacjentów (23).

Wymieniony wcześniej *Coprobacillus* to potencjalny patogen człowieka, zwłaszcza u pacjentów z mechanicznym uszkodzeniem jelit, u których wzrasta ryzyko zakażeń przewodu pokarmowego. W 2020 roku opisano pierwszy przypadek bakteriemii wywołanej przez *Coprobacillus cateniformis* (24).

W dalszych badaniach zmian mikrobiomu jelitowego w przebiegu COVID-19 Zuo i wsp. potwierdził odwrotną korelację między liczebnością (obfitością) *Faecalibacterium prausnitzii* i *Alistipes onderdonkii*, a ciężkością przebiegu COVID-19, czyli im większa była liczba tych bakterii w składzie mikrobioty, tym przebieg choroby był łagodniejszy. Warto tutaj wspomnieć o roli jaką pełnią wymienione drobnoustroje – zmniejszenie populacji *Faecalibacterium prausnitzii* sprzyja procesom zapalnym, natomiast gatunki z rodzaju *Alistipes* modulują odporność. Liczebność bakterii z rodzaju *Alistipes* dodatnio koreluje z liczbą prekursorów limfocytów B (18).

Zespół Zuo odkrył również, że liczebność gatunków *Bacteroides dorei*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides massiliensis* i *Bacteroides ovatus*, jest odwrotnie skorelowana z liczbą kopii wirusa SARS-CoV-2 w kale (18). Kolejna zależność potwierdzona przez ten sam zespół badaczy dotyczyła bakterii jelitowych z rodziny *Erysipelotrichaceae* należących do typu *Firmicutes*. Im większa była liczba tych bakterii w składzie mikrobioty chorych, tym większa była liczba wirusa SARS-CoV-2 w kale (18). Bakterie z rodziny *Erysipelotrichaceae* są powiązane z chorobami przewodu pokarmowego (25).

Stosowanie empirycznie antybiotyków doprowadza do dalszej utraty bakterii symbiotycznych i zaostrzenia

Yeoh et al. analyzed the composition of the gut microbiota also in Asian patients with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection. Analyses were performed in 100 patients during hospitalization, and in 27 patients also 30 days after the elimination of the SARS-CoV-2 virus. Patients suffering from COVID-19 were classified into groups with various degrees of disease severity (mild – without radiological confirmation of pneumonia; moderate – pneumonia was confirmed with fever and respiratory symptoms; severe – respiratory rate ≥ 30 per min and saturation $\leq 93\%$; critical – respiratory failure requiring mechanical ventilation or organ failure requiring intensive care). Critical disease severity was found in 3% of patients, severe disease in 5%, moderate disease in 45%, and mild disease in 47%. The control group consisted of 78 adults negative for the SARS-CoV-2 virus. The composition of the gut microbiome was significantly changed in COVID-19 patients compared to healthy people. In patients with COVID-19, an increased number of *Bacteroidetes* bacteria, species: *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torques*, *Bacteroides dorei*, and depletion of *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Eubacterium rectale* have been observed. Gut bacteria with known immunomodulatory potential such as *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* and several species of *Bifidobacteria* were under-represented in patients and remained low in samples taken 30 days after disease resolution. There was also a negative correlation between the numbers of *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Eubacterium rectale* to the concentration of the CXCL10 chemokine in the blood serum, i.e. an increase in the concentration of the CXCL10 chemokine was observed with the decrease in the number of these bacteria. In contrast, two species of *Bacteroides dorei* and *Akkermansia muciniphila*, which increased number were found in COVID-19 patients, were positively correlated with the level of IL-1 β , IL-6 and the C-X-C motif chemokine ligand 8. Dysbiosis in patients with COVID-19 was dependent on the severity of the disease and the plasma levels of cytokines, chemokines and markers of tissue damage in the blood. The studies of Yeoh et al. confirmed the negative correlation of the number of *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium bifidum* with the severity of the disease symptoms. Yeoh et al. hypothesized that dysbiosis plays an important role in exacerbating the disease, contributing to dysregulation of the immune system response. The team of Yeoh et al. also confirmed that dysbiosis of the intestinal microbiota persists after the patient's recovery. The composition of the gut microbiota in convalescents remained significantly different whether or not they received antibiotics. The use of antibiotic therapy in

dysbiozy jelit u pacjentów z COVID-19, ponieważ antybiotyki mogą eliminować pożyteczne bakterie i osłabiać barierę jelitową (18, 26).

Wyniki badań Zuo i wsp. sugerują, że konfiguracja mikrobiomu jelitowego gospodarza może wpływać na podatność i odpowiedź na zakażenie SARS-CoV-2. Badania wykonano na nielicznej grupie pacjentów pochodzenia azjatyckiego (18).

Zespół Yeoh i wsp. również analizował skład mikrobioty jelitowej u pacjentów pochodzenia azjatyckiego z potwierdzonym laboratoryjnie zakażeniem wirusem SARS-CoV-2. Analizy wykonano u 100 pacjentów w trakcie hospitalizacji, a u 27 pacjentów również 30 dni po eliminacji wirusa SARS-CoV-2. Pacjentów chorych na COVID-19 klasyfikowano do grup o różnym stopniu nasilenia choroby (stopień łagodny – bez radiologicznego potwierdzenia zapalenia płuc; umiarkowany – potwierdzono zapalenie płuc z gorączką i objawami ze strony dróg oddechowych; ciężki – częstość oddechów ≥ 30 /min i saturacja $\leq 93\%$; krytyczny – niewydolność oddechowa wymagająca wentylacji mechanicznej lub niewydolność narządowa wymagająca intensywnej opieki). U 3% chorych stwierdzono krytyczny stopień nasilenia choroby, u 5% chorych – ciężki stopień, u 45% chorych stwierdzono umiarkowane nasilenie choroby, natomiast u 47% chorych łagodne nasilenie choroby. Grupa kontrolna liczyła 78 osób dorosłych z ujemnym wynikiem w kierunku wirusa SARS-CoV-2. Skład mikrobiomu jelitowego był istotnie zmieniony u pacjentów z COVID-19 w porównaniu do osób zdrowych. U osób chorych na COVID-19 zaobserwowano zwiększoną liczbę bakterii typu *Bacteroidetes*, gatunków: *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torques*, *Bacteroides dorei* i zubożenie *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii* oraz *Eubacterium rectale*. Bakterie jelitowe o znanym potencjale immunomodulacyjnym, takie jak *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* i kilka gatunków *Bifidobakterii* były niedostatecznie reprezentowane u pacjentów i utrzymywały się na niskim poziomie w próbkach pobranych 30 dni po ustąpieniu choroby. Wykazano również ujemną korelację liczebności *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii* oraz *Eubacterium rectale* do stężenia chemokiny CXCL10 w surowicy krwi, czyli wraz ze zmniejszeniem liczby tych bakterii obserwowano wzrost stężenia chemokiny CXCL10. Natomiast, dwa gatunki *Bacteroides dorei* i *Akkermansia muciniphila*, których zwiększoną liczbę stwierdzono u chorych na COVID-19, były dodatnio skorelowane z poziomem IL-1 β , IL-6 i ligandem motywu CXC 8. Dysbioza u pacjentów z COVID-19 była zależna od ciężkości przebiegu choroby i stężenia w osoczu cytokin, chemokin i markerów uszkodzenia tkanek we krwi. Badania Yeoh i wsp. potwierdziły ujemną korelację liczebności *Faecalibacterium prausnitzii* i *Bifidobacterium bifidum*

the course of COVID-19 increased the change in the composition of the microbiota (27).

In 2021, Hungarian scientists Babszky et al. studied the gut microbiome in a group of patients with mild COVID-19. 20 people doing sports and 20 people leading a sedentary lifestyle were qualified for the study. The intestinal microbiome was analyzed during SARS-CoV-2 infection and three weeks after the negative COVID-19 PCR test. The conducted studies did not confirm the differences in the composition of the intestinal microbiome in people who play sports and lead a sedentary lifestyle, but it was confirmed that during mild COVID-19 infection, the number of bacteria of the *Bacteroidetes* type increased (28).

SUMMARY

Studies on the composition of the intestinal microbiota in humans in the course of COVID-19 disease, as well as after the elimination of the SARS-CoV-2 virus, revealed changes characterized by an increase in the number of opportunistic pathogens and a decrease in the number of symbiotic commensals with known immunomodulatory potential, e.g. *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*. Based on the conducted research, it was confirmed that changes in the composition of the intestinal microbiota correlate with the intensity of COVID-19 and with the concentration of cytokines, chemokines and markers of tissue damage in the plasma. After elimination of the SARS-CoV-2 virus from the host organism and after the disease symptoms have subsided, intestinal dysbiosis persists. However, longer observation of patients is necessary to determine the duration of dysbiosis after recovery, and the relationship between dysbiosis and persistent symptoms after the disease.

The composition of the gut microbiota is highly heterogeneous in human populations, and the changes in microbiota composition described in the works cited in this article are not necessarily reflected in COVID-19 patients from other geographic areas. Further studies on changes in the gut microbiota are recommended to understand the involvement and role of microbes in modulating the inflammatory response in the patient.

REFERENCES

1. Malinowska M, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Mikrobiom człowieka. *Post Mikrobiol* 2017;56,1:33–42.
2. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 2016;352(6285):565-569.

ze stopniem nasilenia objawów choroby. Yeoh i wsp. postawili hipotezę, że dysbioza odgrywa istotną rolę w zaostrzeniu choroby, przyczyniając się do rozregulowania odpowiedzi układu odpornościowego. Zespół Yeoh i wsp. potwierdził również, że dysbioza mikrobioty jelitowej utrzymuje się po wyleczeniu pacjenta. Skład mikrobioty jelitowej u ozdowieńców pozostawał znacząco różny, niezależnie od tego, czy otrzymywali antybiotyki. Stosowanie antybiotykoterapii w przebiegu COVID-19 potęgowało zmianę składu mikrobioty (27).

W 2021 roku węgierscy naukowcy Babszky i wsp. badali mikrobiom jelitowy w grupie osób chorych z łagodnym przebiegiem COVID-19. Do badania zakwalifikowano 20 osób uprawiających sport i 20 osób prowadzących siedzący tryb życia. Analizowano mikrobiom jelitowy w trakcie zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i trzy tygodnie po negatywnym teście PCR na COVID-19. Przeprowadzone badania nie potwierdziły różnic w składzie mikrobiomu jelitowego u osób trenujących i prowadzących siedzący tryb życia, potwierdzono natomiast, że podczas łagodnej infekcji COVID-19 zwiększyła się liczebność bakterii typu *Bacteroidetes* (28).

PODSUMOWANIE

Badania składu mikrobioty jelitowej u człowieka w przebiegu choroby COVID-19, jak również po eliminacji wirusa SARS-CoV-2, ujawniły zmiany, które charakteryzowały się zwiększeniem liczebności patogenów oportunistycznych i zmniejszeniem liczby symbiotycznych komensali o znanym potencjale immunomodulatoryjnym np. *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*. Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzono, że zmiany składu mikrobioty jelit korelują z nasileniem COVID-19 i ze stężeniem w osoczu cytokin, chemokin oraz markerów uszkodzenia tkanek. Po eliminacji wirusa SARS-CoV-2 z organizmu gospodarza i po ustąpieniu objawów chorobowych, utrzymuje się dysbioza jelit. Konieczna jest jednak dłuższa obserwacja pacjentów, aby określić czas utrzymywania się dysbiozy po wyzdrowieniu, oraz związku między dysbiozą a utrzymującymi się objawami po chorobie.

Skład mikrobioty jelitowej jest wysoce niejednorodny w populacjach ludzkich, a zmiany w składzie mikrobioty opisane w pracach cytowanych w niniejszym artykule niekoniecznie muszą być odzwierciedlone u pacjentów z COVID-19 z innych obszarów geograficznych. Wskazane są dalsze badania zmian mikrobioty jelitowej aby poznać zaangażowanie i rolę drobnoustrojów w modulacji odpowiedzi zapalnej u chorego.

3. D'Argenio V, Salvatore F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta* 2015;451:97-102.
4. Radjabzadeh D, Boer CG, Beth SA, et al. Diversity, compositional and functional differences between gut microbiota of children and adults. *Scientific Reports* 2020;10:1040.
5. Panasiuk A, Kowalińska J. Mikrobiota przewodu pokarmowego. Warszawa: Wydaw. Lek. PZWL; 2019: strona 81
6. Olszewska J, Jagusztyn-Krynicka EK. Human Microbiome Project - Mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post Mikrobiol* 2012;51,4:243-256
7. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68(4):669-85.
8. Binek M. Mikrobiom człowieka – zdrowie i choroba. *Post Mikrobiol* 2012;51,1:27-36
9. Juszczuk-Kubiak E, Greguła-Kania M, Sokołowska B. Technologie „Food-omics” w profilowaniu metagenomu żywności. *Post Mikrobiol* 2021;60,1:59-75
10. Ranjan R, Rani A, Metwally A, et al. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;469(4):967-77.
11. Esakandari H, Nabi-Afjadi M, Fakkari-Afjadi J, et al. A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biol Proced Online* 2020;22:19.
12. D'Amico F, Baumgart DC, Danese S, et al. Diarrhea During COVID-19 Infection: Pathogenesis, Epidemiology, Prevention, and Management. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020;18(8):1663-1672.
13. Liang W, Feng Z, Rao S, et al. Diarrhoea may be underestimated: a missing link in 2019 novel coronavirus. *Gut* 2020;69(6):1141-1143.
14. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020;395:565-574.
15. Zhang H, Kang Z, Gong H, et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCov infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes. *Gut* 2020;69:973-974.
16. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 2020;159(1):81-95.
17. Xu Y, Li X, Zhu B, et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nature Medicine* 2020;26:502–505.
18. Zuo T, Zhang F, Lui GCY, et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology* 2020;159:944–955.
19. Randazzo A, Kornreich A, Lissour B. A *Clostridium hathewayi* isolate in blood culture of a patient with an acute appendicitis. *Anaerobe* 2015;35(Pt B):44-7.
20. Elsayed S, Zhang K. Human Infection Caused by *Clostridium hathewayi*. *Emerg Infect Dis* 2004;10(11):1950-1920.
21. Steer T, Collins MD, Gibson GR, et al. *Clostridium hathewayi* sp. nov., from human faeces. *Syst Appl Microbiol* 2001;24(3):353-7.
22. Forrester JD, Spain DA. *Clostridium ramosum* bacteremia: case report and literature review. *Surg Infect (Larchmt)* 2014;15(3):343-6.
23. Legaria MC, Garcia SD, Tudanca V, et al. *Clostridium ramosum* rapidly identified by MALDI-TOF MS. A rare gram-variable agent of bacteraemia. *Access Microbiol* 2020;15;2(8).
24. Heo WY, Lee JK, Chung YN, et al. First Case of Bacteremia Caused by *Coprobacillus cateniformis*. *Ann Lab Med* 2020;40(5):421–423.
25. Kaakoush NO, Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:84.
26. Vera-Lise Tulstrup M, Christensen EG, et al. Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. *PLoS One* 2015;10(12):e0144854.
27. Yeoh YK, Zuo T, Lui GCY, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut* 2021;70(4):698-706.
28. Babszky G, Torma F, Aczel D, et al. COVID-19 Infection Alters the Microbiome: Elite Athletes and Sedentary Patients Have Similar Bacterial Flora; *Genes (Basel)* 2021;12(10):1577.

Received: 26.01.2022

Accepted for publication: 15.07.2022

Otrzymano: 26.01.2022 r.

Zaakceptowano do publikacji: 15.07.2022 r.

Address for correspondence:

Adres do korespondencji:

Agata Stepuch

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH -

Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Bakteriologii i Zwalczenia Skażeń

Biologicznych

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

e-mail: astepuch@pzh.gov.pl