



Состав микробиоты ротоглотки у пациентов с пневмонией различной степени тяжести, вызванной вирусом SARS-CoV-2

Е.В. Старикова¹, Ю.С. Галеева^{✉1}, Д.Н. Андреев², Ф.С. Соколов², Д.Е. Федоров¹, А.И. Манолов¹, А.В. Павленко¹, К.М. Климина³, В.А. Веселовский³, А.В. Заборовский², В.В. Евдокимов², Н.Г. Андреев², М.К. Девкота², А.К. Фоменко², В.А. Харьковский², П.О. Асадулин², С.А. Кучер², А.С. Черёмушкина², О.О. Янушевич², И.В. Маев², Н.И. Крихели², О.В. Левченко², Е.Н. Ильина¹, В.М. Говорун¹

¹ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия;

³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА России, Москва, Россия

Аннотация

Цель. Выявить особенности таксономического состава микробиоты ротоглотки пациентов с COVID-19 с различной степенью тяжести заболевания.

Материалы и методы. Исследуемая группа пациентов включала в себя 156 пациентов, госпитализированных с подтвержденным диагнозом COVID-19 в клинический медицинский центр ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» в период с апреля по июнь 2021 г., из них 77 пациентов – с легкой формой пневмонии по данным компьютерной томографии (КТ) – КТ-1 и 79 пациентов с умеренной и среднетяжелой формой пневмонии (КТ-2 и КТ-3). Отбор мазков из ротоглотки осуществляли при поступлении пациента в стационар. Из образцов выделяли тотальную ДНК, затем производили амплификацию V3–V4 регионов гена *16s* рПНК с последующим секвенированием на приборе Illumina HiSeq 2500. Для получения вариантов ампликонных последовательностей (ASV) использовался алгоритм DADA2.

Результаты. При сравнении микробного состава ротоглотки пациентов с различной формой пневмонии обнаружены ASV, ассоциированные с развитием как легкой, так и тяжелой форм пневмонии вне лечения в стационаре. Исходя из полученных результатов можно заключить, что ASV, ассоциированные с меньшей степенью поражения легких, в основном относятся к классу грамтрицательных фирмикут (*Negativicutes*), к различным классам протеобактерий, а также к порядку *Fusobacteria*. В свою очередь ASV, ассоциированные с большей степенью поражения легких, относятся преимущественно к грамположительным фирмикутам классов *Bacilli* и *Clostridia*. При нахождении в стационаре пациенты с тяжелой формой пневмонии достоверно чаще демонстрировали отрицательную динамику на фоне проводимых терапевтических мероприятий.

Заключение. Различия в таксономическом составе микробиоты ротоглотки, наблюдающиеся у пациентов с различной формой пневмонии, развившейся вне стационарного лечения на фоне COVID-19, могут быть связаны с предположительной барьерной функцией микробиоты ротоглотки, которая позволяет снизить риск нарастания титра вируса.

Ключевые слова: COVID-19, микробиота, метагеном, ротовая полость, SARS-CoV-2

Для цитирования: Старикова Е.В., Галеева Ю.С., Андреев Д.Н., Соколов Ф.С., Федоров Д.Е., Манолов А.И., Павленко А.В., Климина К.М., Веселовский В.А., Заборовский А.В., Евдокимов В.В., Андреев Н.Г., Девкота М.К., Фоменко А.К., Харьковский В.А., Асадулин П.О., Кучер С.А., Черёмушкина А.С., Янушевич О.О., Маев И.В., Крихели Н.И., Левченко О.В., Ильина Е.Н., Говорун В.М. Состав микробиоты ротоглотки у пациентов с пневмонией различной степени тяжести, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Терапевтический архив. 2022;94(8):963–972. DOI: 10.26442/00403660.2022.08.201780

Информация об авторах / Information about the authors

✉ **Галеева Юлия Сергеевна** – мл. науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. E-mail: olgagaleeva546@gmail.com; ORCID: 0000-0001-6304-4607

Старикова Елизавета Валентиновна – науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0001-6582-210X

Андреев Дмитрий Николаевич – канд. мед. наук, доц., доц. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-4007-7112

Соколов Филипп Сергеевич – врач-специалист отделения микробиологического анализа Клинического центра COVID-19, ст. лаборант каф. ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни – залог успешного развития» ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0003-2813-6498

Федоров Дмитрий Евгеньевич – мл. науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0001-8468-7011

Манолов Александр Иванович – науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0003-3912-429X

Павленко Александр Владимирович – науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0002-9549-0289

Климина Ксения Михайловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБУ ФНКЦ ФХМ. ORCID: 0000-0002-5563-644X

Веселовский Владимир Александрович – мл. науч. сотр. ФГБУ ФНКЦ ФХМ. ORCID: 0000-0002-4336-9452

Заборовский Андрей Владимирович – д-р мед. наук, доц., зав. каф. фармакологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-7923-9916

Евдокимов Владимир Вячеславович – д-р мед. наук, проф., нач. управления науки ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0001-9281-579X

✉ **Julia S. Galeeva.** E-mail: olgagaleeva546@gmail.com; ORCID: 0000-0001-6304-4607

Elizaveta V. Starikova. ORCID: 0000-0001-6582-210X

Dmitry N. Andreev. ORCID: 0000-0002-4007-7112

Philipp S. Sokolov. ORCID: 0000-0003-2813-6498

Dmitry E. Fedorov. ORCID: 0000-0001-8468-7011

Aleksander I. Manolov. ORCID: 0000-0003-3912-429X

Alexander V. Pavlenko. ORCID: 0000-0002-9549-0289

Ksenia M. Klimina. ORCID: 0000-0002-5563-644X

Vladimir A. Veselovsky. ORCID: 0000-0002-4336-9452

Andrew V. Zaborovsky. ORCID: 0000-0002-7923-9916

Vladimir V. Evdokimov. ORCID: 0000-0001-9281-579X

Composition of oropharyngeal microbiota in patients with COVID-19 of different pneumonia severity

Elizaveta V. Starikova¹, Julia S. Galeeva^{✉1}, Dmitry N. Andreev², Philipp S. Sokolov², Dmitry E. Fedorov¹, Aleksander I. Manolov¹, Alexander V. Pavlenko¹, Ksenia M. Klimina³, Vladimir A. Veselovsky³, Andrew V. Zaborovsky², Vladimir V. Evdokimov², Nikolai G. Andreev², Mikhail K. Devkota², Aleksei K. Fomenko², Vadim A. Khar'kovskii², Pavel O. Asadulin², Sergey A. Kucher², Aleksandra S. Cheremushkina², Oleg O. Yanushevich², Igor V. Maev², Natella I. Krikheli², Oleg V. Levchenko², Elena N. Ilina¹, Vadim M. Govorun¹

¹Research Institute of Systemic Biology and Medicine, Moscow, Russia;

²Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

³Federal Scientific and Clinical Center for Physical and Chemical Medicine, Moscow, Russia

Abstract

Aim. To identify features of the taxonomic composition of the oropharyngeal microbiota of COVID-19 patients with different disease severity.

Materials and methods. The study group included 156 patients hospitalized with confirmed diagnosis of COVID-19 in the clinical medical center of Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry between April and June 2021. There were 77 patients with mild pneumonia according to CT (CT1) and 79 patients with moderate to severe pneumonia (CT2 and CT3). Oropharyngeal swabs were taken when the patient was admitted to the hospital. Total DNA was isolated from the samples, then V3–V4 regions of the 16S rRNA gene were amplified, followed by sequencing using Illumina HiSeq 2500 platform. DADA2 algorithm was used to obtain amplicon sequence variants (ASV).

Results. When comparing the microbial composition of the oropharynx of the patients with different forms of pneumonia, we have identified ASVs associated with the development of both mild and severe pneumonia outside hospital treatment. Based on the results obtained, ASVs associated with a lower degree of lung damage belong predominantly to the class of Gram-negative Firmicutes (Negativicutes), to various classes of *Proteobacteria*, as well as to the order *Fusobacteriia*. In turn, ASVs associated with a greater degree of lung damage belong predominantly to Gram-positive classes of Firmicutes – *Bacilli* and *Clostridia*. While being hospitalized, patients with severe pneumonia demonstrated negative disease dynamics during treatment significantly more often.

Conclusion. We have observed differences in the taxonomic composition of the oropharyngeal microbiota in patients with different forms of pneumonia developed outside hospital treatment against COVID-19. Such differences might be due to the presumed barrier function of the oropharyngeal microbiota, which reduces the risk of virus titer increase.

Keywords: COVID-19, microbiota, metagenome, oral cavity, SARS-CoV-2

For citation: Starikova EV, Galeeva JuS, Andreev DN, Sokolov PS, Fedorov DE, Manolov AI, Pavlenko AV, Klimina KM, Veselovsky VA, Zaborovsky AV, Evdokimov VV, Andreev NG, Devkota MK, Fomenko AK, Khar'kovskii VA, Asadulin PO, Kucher SA, Cheremushkina AS, Yanushevich OO, Maev IV, Krikheli NI, Levchenko OV, Ilina EN, Govorun VM. Composition of oropharyngeal microbiota in patients with COVID-19 of different pneumonia severity. *Terapevticheskiy Arkhiv* (Ter. Arkh.). 2022;94(8):963–972. DOI: 10.26442/00403660.2022.08.201780

Введение

Течение COVID-19 зачастую осложняют сопутствующие бактериальные инфекции, которые могут определять клинический исход. Часть вторичных инфекций вызывают микроорганизмы, попадающие в легкие из верхних дыхательных путей. Не меньшую роль играют бактерии ротовой полости: с током слюны они попадают в глотку, откуда при вдыхании могут попасть в нижние дыхательные пути. Известно, что микробиота полости рта является второй по

величине уровня α-разнообразия после микробиоты желудочно-кишечного тракта, включая более 700 видов бактерий, более 100 видов грибов и простейших [1]. Имеются сведения о влиянии состояния твердых тканей зубов и слизистой оболочки полости рта на частоту развития аспирационных пневмоний [2].

Особый интерес в свете анализа связи SARS-CoV-2 с бактериями верхних дыхательных путей и ротовой полости представляет ротоглотка, так как именно она чаще всего

Андреев Николай Германович – канд. мед. наук, доц., доц. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-5136-0140

Девкота Михаил Кумарович – врач-специалист отделения микробиологического анализа Клинического центра COVID-19, преподаватель каф. фармакологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-3736-4196

Фоменко Алексей Константинович – врач-специалист отделения микробиологического анализа Клинического центра COVID-19, преподаватель каф. фармакологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-1794-7263

Харьковский Вадим Александрович – врач-специалист отделения микробиологического анализа Клинического центра COVID-19 ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0001-8659-3502

Асадулин Павел Олегович – врач-специалист отделения микробиологического анализа Клинического центра COVID-19 ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0001-5236-1770

Кучер Сергей Андреевич – врач-специалист отделения микробиологического анализа Клинического центра COVID-19 ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0001-7981-1786

Nikolai G. Andreev. ORCID: 0000-0002-5136-0140

Mikhail K. Devkota. ORCID: 0000-0002-3736-4196

Aleksei K. Fomenko. ORCID: 0000-0002-1794-7263

Vadim A. Khar'kovskii. ORCID: 0000-0001-8659-3502

Pavel O. Asadulin. ORCID: 0000-0001-5236-1770

Sergey A. Kucher. ORCID: 0000-0001-7981-1786

является входными воротами возбудителей респираторных инфекций, в том числе SARS-CoV-2 [3]. Предполагается, что состав микробиоты полости рта и ротоглотки может оказывать влияние на развитие и течение COVID-19, либо выступая в качестве барьера, тем или иным способом подавляя репликацию вируса, либо являясь источником вторичной бактериальной инфекции, что в свою очередь может влиять на тяжесть течения болезни и клинический исход.

В данном исследовании мы сравнили таксономический состав микробиоты ротоглотки пациентов с COVID-19 до получения ими специализированной терапии в условиях стационара и выявили таксоны, ассоциированные с различной формой пневмонии, развившейся на фоне основного заболевания. При этом учитывалось состояние твердых тканей зубов и слизистой оболочки полости рта пациента в качестве ковариатов, влияющих на конечный результат биоинформатического анализа.

Материалы и методы

Клиническая группа. В исследование включены 156 пациентов с лабораторно подтвержденной новой коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2 и клиническими проявлениями COVID-19, которые проходили лечение на базе многопрофильного клинического медицинского центра «Кусково» ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» в период с апреля по июнь 2021 г. Возраст пациентов составил от 20 до 82 лет, из них 68 пациентов мужского пола и 88 – женского пола. Госпитализированы 77 пациентов с поражением легких менее 25% по данным компьютерной томографии (КТ) – КТ-1, 66 – с поражением 35–50% (КТ-2) и 13 – с поражением 50–75% (КТ-3), при этом 53 человека нуждались в принудительной кислородотерапии (рис. 1).

Критерии включения в изучаемую группу:

- письменное согласие участника на участие в исследовании;
- подтвержденный тестом с помощью метода полимеразной цепной реакции диагноз COVID-19;
- возраст старше 18 лет.

Критерии исключения:

- тяжелое состояние с угрозой для жизни или противопоказания, препятствующие забору биоматериала;
- онкологические заболевания вне стадии ремиссии.

Также на основе опросников собраны данные о сопутствующих заболеваниях. Врачом-стоматологом проведены

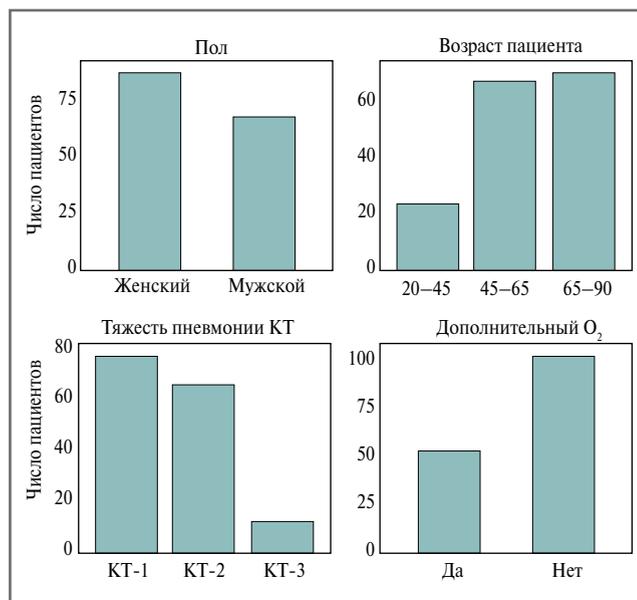


Рис. 1. Распределение числа пациентов с диагностированным COVID-19 по возрасту, полу, степени поражения легких (КТ) и потребности в дополнительной подаче кислорода.

Fig. 1. Distribution of the number of patients diagnosed with COVID-19 by age, gender, degree of lung injury (CT), and need for supplemental oxygen.

осмотры полости рта пациентов с заполнением индекса количественного показателя кариозных, пломбированных и удаленных зубов (КПУ) и папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса (РМА) для оценки состояния твердых тканей зубов и слизистой оболочки полости рта. Также проводилась оценка гигиены пациентов с помощью индекса эффективности гигиены (РНР). Согласно данным опросникам 7 пациентов имели диагноз «хроническая обструктивная болезнь легких» (ХОБЛ), 30 – сахарный диабет, 23 – воспалительные заболевания кишечника и 98 – сердечно-сосудистые заболевания.

По стоматологическому статусу 63 пациента имели высокую резистентность эмали зубов к кариесу и здоровый

Черёмушкина Александра Сергеевна – студентка лечебного фак-та ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-1089-4322

Янушевич Олег Олегович – акад. РАН, д-р мед. наук, проф., ректор, зав. каф. пародонтологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-4293-8465

Маев Игорь Вениаминович – акад. РАН, д-р мед. наук, проф., зав. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0001-6114-564X

Крихели Нателла Ильинична – д-р мед. наук, проф., зав. каф. клинической стоматологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-8035-0638

Левченко Олег Валерьевич – д-р мед. наук, проф. каф. нейрохирургии и нейрореанимации ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0003-0857-9398

Ильина Елена Николаевна – чл.-кор. РАН, проф. РАН, д-р биол. наук, гл. науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0003-0130-5079

Говорун Вадим Маркович – акад. РАН, д-р биол. наук, проф., врио дир. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0003-0837-8764

Aleksandra S. Cheremushkina. ORCID: 0000-0002-1089-4322

Oleg O. Yanushevich. ORCID: 0000-0002-4293-8465

Igor V. Maev. ORCID: 0000-0001-6114-564X

Natella I. Krikheli. ORCID: 0000-0002-8035-0638

Oleg V. Levchenko. ORCID: 0000-0003-0857-9398

Elena N. Ilina. ORCID: 0000-0003-0130-5079

Vadim M. Govorun. ORCID: 0000-0003-0837-8764

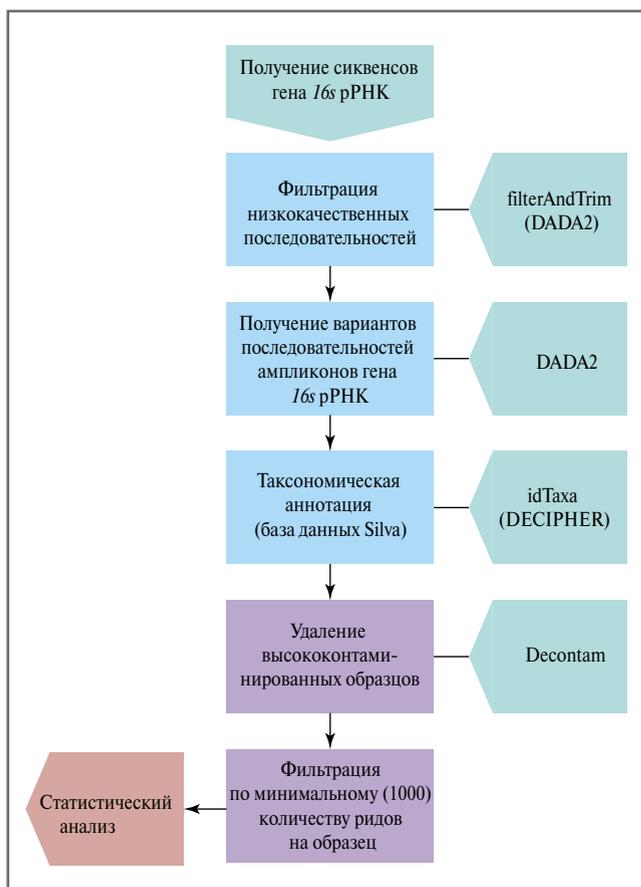


Рис. 2. Схема биоинформатической обработки последовательностей ампликонов гена *16s* рРНК образцов пациентов.

Fig. 2. Scheme of bioinformatics processing of *16s* rRNA gene amplicon sequences from patient samples.

пародонт, 93 имели множественные кариозные поражения зубов и заболевания пародонта. При измерении индекса РМА у 130 человек наблюдался гингивит легкой степени тяжести и у 26 – гингивит средней степени тяжести. Индексом КПУ измеряли интенсивность кариеса: 65 человек с высокой, 80 – со средней и 11 – с низкой интенсивностью кариеса. При оценке гигиены полости рта пациентов использовался индекс РНР, по результатам которого 54 пациента имели хороший индекс гигиены, 83 – средний и 19 – неудовлетворительный.

Кроме того, 78 пациентов принимали антибиотики в течение месяца до госпитализации.

Забор биоматериала осуществляли при помощи ватного тампона с пораженных участков ротоглотки – миндалин, не касаясь слизистой языка и полости рта. При необходимости биоматериал также забирали с дужек мягкого неба, небного язычка и задней стенки глотки. После забора образцов 2 зонда с ватным тампоном помещали в промаркированную криобирку объемом 1,8 мл и подвергали немедленной заморозке. Хранение биоматериала осуществляли при температуре -70°C .

Метагеномное секвенирование. Выделение тотальной ДНК проводили с помощью набора MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit (Roche) и автоматической выделительной станции KingFisher Flex. Подготовку библиотек и их секвенирование осуществляли в соответствии с прото-

колом 16S Metagenomic Sequencing Library preparation для MiSeq, Illumina.

Приготовление геномных библиотек проводили набором Tersus PCR kit (Evrogen, Россия), для амплификации переменного региона V3–V4 гена *16s* рРНК использовали праймеры 341F и 801R, для баркодирования образцов использовали уникальные комбинации индексирующих праймеров, являющихся аналогами праймеров из набора Nextera XT Index kit v2.

Процедуру секвенирования осуществляли с помощью инструмента HiSeq 2500 с использованием набора расходных материалов HiSeq Rapid SBS Kit v2 (500) (Illumina) согласно рекомендациям производителя.

Биоинформатическая обработка. Фильтрацию низкокачественных последовательностей проводили с помощью метода filterAndTrim из пакета DADA2. Для получения вариантов последовательностей ампликонов использовали пакет DADA2 [4].

Полученные последовательности ампликонов таксономически аннотировали методом idTaxa из пакета DECIPHER (версия 11.7) с использованием базы последовательностей рибосомальных РНК Silva (версия 138.1, nr99).

Для идентификации и удаления контаминантных последовательностей использовали пакет Decontam, использующий в качестве критерия обратную зависимость концентрации ДНК образца и представленности последовательностей [5]. Полная схема биоинформатической обработки представлена на рис. 2.

Статистический анализ представленностей последовательностей ампликонов выполняли на языке программирования R (версия 4.0.2).

Для расчета индекса β -разнообразия значения представленности вариантов последовательностей ампликонов (ASV, Amplicon Sequence Variant) нормализовали при помощи функции transform пакета microbiome (версия 1.10.0). Матрицу попарных расстояний рассчитывали по метрике Брея–Кертиса с помощью функции dist пакета phyloseq (версия 1.32.0).

Значение меры α -разнообразия рассчитывали как индекс Шеннона при помощи функции plot_richness пакета phyloseq (версия 1.32.0) [6].

Для определения достоверности попарного различия сообществ по составу микробиоты и вклада метаданных пациентов в данное различие использовали метод непараметрического дисперсионного анализа (функция adonis пакета vegan, версия 2.5-7) с оценкой значимости при 999 перестановках. Анализ дифференциальной представленности для групп сравнения (КТ-1 и КТ \geq 2) выполнен с использованием инструмента Deseq 2 (версия 1.28.1) [7].

Ввиду того, что между группами пациентов присутствовали различия по набору метаданных, статистический анализ проводили с учетом влияния данных факторов в качестве ковариат на состав микробиоты.

Для получения устойчивых, воспроизводимых результатов анализ проводили в 25 итерациях, в каждой из которых случайным образом выбирали 80% образцов. Полученные данные отфильтрованы в соответствии с выбранными нами пороговыми воспроизводимости: «строгим» (ASV, достоверные различия в представленности которых между группами воспроизводятся минимум 20 раз из 25) и «умеренным» (ASV, достоверные различия в представленности которых между группами воспроизводятся минимум 15 раз из 25). При проверке статистических гипотез минимальный уровень α составил 0,05 (по методу Бенджамини–Хохберга), а размер эффекта \log_2 foldchange – 1.5.

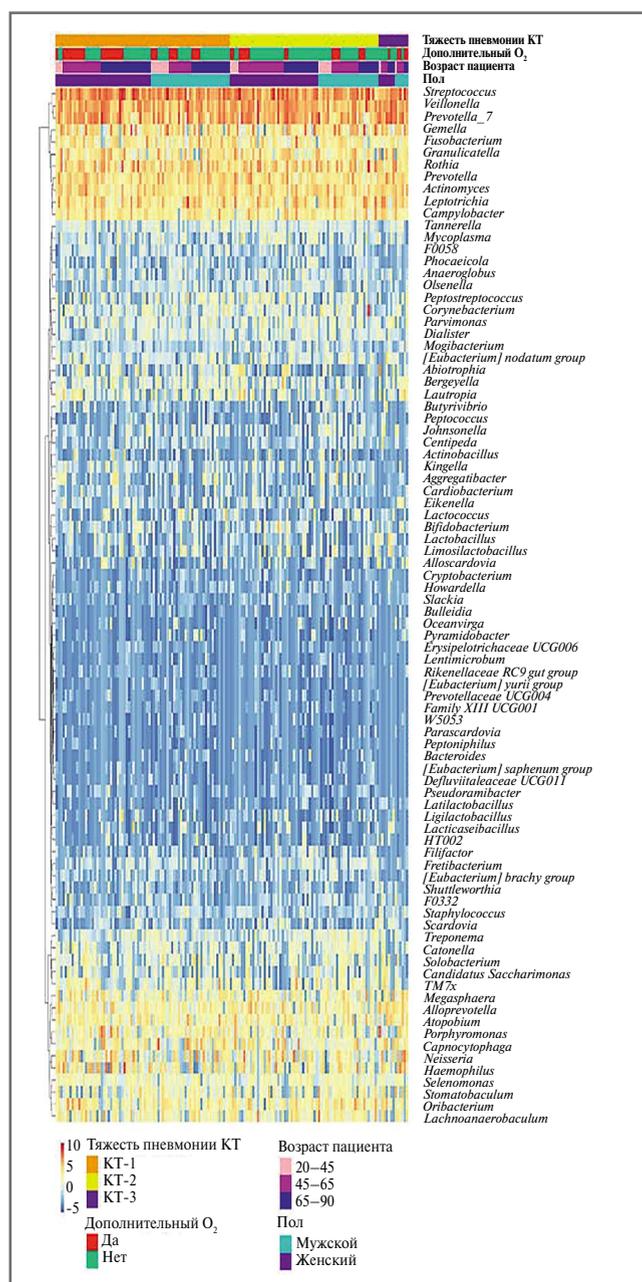


Рис. 3. Тепловая карта представленности родов прокариот в образцах ротоглотки 156 пациентов с различной степенью поражения легких (обозначено желтым, оранжевым и фиолетовым цветом в верхней панели; КТ). Цвета тепловой карты отражают значения представленности соответствующих бактериальных родов после преобразования CLR (centered log ratio transform).

Fig. 3. Heat map of representation of prokaryotic genera in oropharyngeal samples of 156 patients with varying degrees of lung involvement (indicated in yellow, orange, and purple in the upper panel; CT). The colors of the heat map reflect the representation values of the corresponding bacterial genera after the CLR (centered log ratio transform).

Результаты

Организация сбора клинического материала и мета-данных. Исследуемая выборка сформирована из пациентов, поступивших на лечение в многопрофильный кли-

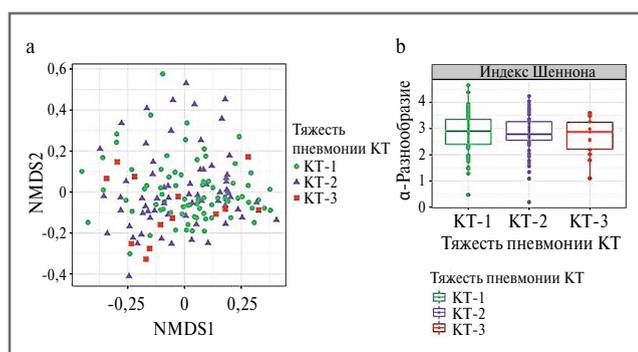


Рис. 4: а – график сходства таксономического состава (β -разнообразия) метагеномов пациентов с разной степенью поражения легких по КТ: КТ-1 ($n=77$), КТ-2 ($n=66$), КТ-3 ($n=13$) на основании NMDS по видовому разнообразию (метрика различия: мера Брея–Кертиса) методом главных компонент; б – таксономическое разнообразие (α -разнообразие) микробиоты пациентов с разной степенью поражения легких по КТ: КТ-1 ($n=77$), КТ-2 ($n=66$), КТ-3 ($n=13$), рассчитанное как индекс Шеннона.

Fig. 4: а – graph of the similarity of the taxonomic composition (β -diversity) of metagenomes of patients with different degrees of lung damage according to CT: CT-1 ($n=77$), CT-2 ($n=66$), CT-3 ($n=13$) based on NMDS for species diversity (difference metric: Bray–Curtis measure) principal component analysis; б – axonomic diversity (α -diversity) of the microbiota of patients with varying degrees of lung damage according to CT: CT-1 ($n=77$), CT-2 ($n=66$), CT-3 ($n=13$), calculated as an index Shannon.

нический медицинский центр «Кусково» с лабораторно подтвержденной новой коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2. При соответствии пациента критериям включения/исключения от него забраны мазки из ротоглотки на метагеномное тестирование. Деперсонализированные мета-данные внесены в информационную систему, разработанную под задачи настоящего исследования с использованием международных практик и основанную на стандарте медицинских данных HL7 FHIR. Применение электронной системы обеспечило сбор информации о пациентах в едином формате, что является необходимым условием проведения дальнейшего биоинформатического анализа данных.

Метагеномное секвенирование. Собранные у поступивших в стационар пациентов мазки ротоглотки подвергнуты метагеномному секвенированию переменного участка V3–V4 гена 16s рРНК. С использованием генетического анализатора Illumina HiSeq 2500 для всей совокупности образцов получены прочтения длиной около 550 нуклеотидов. Среднее число прочтений на образец составило 45465.68.

Таксономический состав микробиоты ротоглотки пациентов с COVID-19. Исследование общего таксономического состава микробиоты ротоглотки пациентов с различной степенью поражения легких по данным КТ выявило 768 ASV (amplicon sequence variants – вариантов последовательностей ампликонов), принадлежащих 97 бактериальным родам (рис. 3). Наиболее распространенными родами являлись *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Rothia*, *Actinomyces* и *Leptotrichia*, что соответствует литературным данным о таксономическом составе микробиоты ротоглотки человека [8].

Оценка β -разнообразия ASV сообществ образцов пациентов с разной формой пневмонии, развившейся на фоне

COVID-19, проводилась при помощи неметрического многомерного шкалирования (Non-Metric Multidimensional Scaling – NMDS) по метрике Брея–Кертиса (Bray–Curtis); **рис. 4, а**. Расстояния между точками на графике соответствуют степени сходства таксономического состава образцов. При оценке β -разнообразия бактериальных сообществ исследуемых групп существенные различия не выявлены.

При оценке значений α -разнообразия микробных сообществ на основании сравнения значений индекса разнообразия Шеннона (**рис. 4, б**) не выявлено значимых различий между группами пациентов с различной степенью поражения легких (КТ-1 и КТ \geq 2).

Анализ вклада метаданных в вариацию дисперсии состава микробиома

Дисперсия состава микробиоты, объясняемая метаданными, рассчитана методом перестановочного многомерного дисперсионного анализа с использованием матриц расстояний, реализованного в функции *adonis*. При выполнении анализа собранные метаданные объединены в группы, такие как стоматологические показатели: стоматологический статус, индекс РМА, индекс РНР, индекс КПУз; состояние пациентов: степень тяжести пневмонии по КТ, потребность в дополнительном O_2 , прием антибиотиков в течение месяца до госпитализации; физиологические показатели: пол, возраст; хронические заболевания сердечно-сосудистой системы, ХОБЛ, сахарный диабет, воспалительные заболевания кишечника (**рис. 5**). По результатам анализа данные показатели объяснили 12% дисперсии таксономического состава микробиоты, при этом наибольший вклад внесли стоматологические показатели и показатели состояния пациентов (4,5 и 3,1% вариации дисперсии соответственно).

Различия в таксономическом составе микробиоты ротоглотки пациентов с разной степенью поражения легких на фоне COVID-19

В результате анализа дифференциальной представленности последовательностей ампликонов гена *16s* рРНК образцов пациентов с различной степенью поражения легких выявлены последовательности, предположительно ассоциированные с более тяжелой (КТ \geq 2) или более легкой (КТ-1) формой пневмонии, развившейся вне стационарного лечения (**рис. 6**).

Результаты оценивались на двух порогах воспроизводимости: «строгом» (ASV, воспроизводимые в \geq 20 итерациях из 25); **см. рис. 6, а**; и «умеренном» (ASV, воспроизводимые в \geq 15 итерациях из 25); **см. рис. 6, б**.

После фильтрации результатов по «строгому» порогу воспроизводимости выявлено 18 вариантов последовательностей ампликонов (ASV), предположительно ассоциированных с меньшей степенью поражения легких. Они соответствовали таксонам класса *Negativicutes* (*Veillonella*), типа *Bacteroidetes* (*Capnocytophaga*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella* и *Prevotella*), а также классам α - (*Lautropia*, *Neisseria*) и γ -протеобактерий (*Haemophilus*). Также выявлены ASV, относящиеся к роду *Actinomyces* и к филуму *Saccharibacteria* (ранее известному как TM7). При фильтрации результатов по «умеренному» порогу воспроизводимости дополнительно выявлено 15 ASV, соответствующих таксонам классов *Negativicutes* (*Anaeroglobus*, *Selenomonas*), γ -протеобактерий (*Aggregatibacter*) и ϵ -протеобактерий (*Campylobacter*), типа *Actinobacteria* (*Atopobium*) и порядку *Fusobacteria* (*Leptotrichia*).

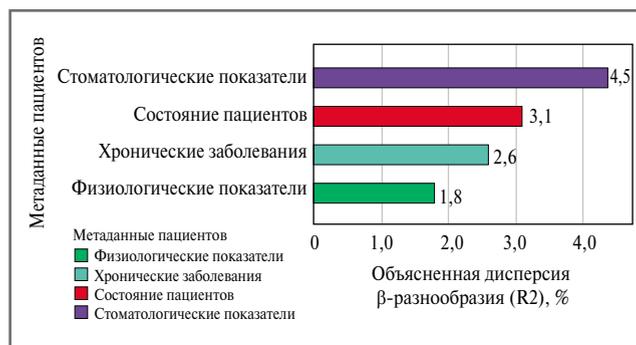


Рис. 5. Вклад групп метаданных в вариацию дисперсии таксономического состава микробиоты образцов пациентов.

Физиологические показатели: пол, возраст. Хронические заболевания: хронические болезни сердечно-сосудистой системы, ХОБЛ, сахарный диабет, воспалительные заболевания кишечника. Состояние пациентов: степень тяжести пневмонии по данным КТ, потребность в дополнительном O_2 , прием антибиотиков в течение месяца до госпитализации. Стоматологические показатели: стоматологический статус, индекс РМА, индекс РНР, индекс КПУз.

Fig. 5. The contribution of metadata groups to the variation in the variance of the taxonomic composition of the microbiota of patient samples. Physiological indicators: gender, age. Chronic diseases: chronic diseases of the cardiovascular system, COPD, diabetes mellitus, inflammatory bowel disease. Patients' condition: the severity of pneumonia according to CT, the need for additional O_2 , taking antibiotics within a month before hospitalization. Dental indicators: dental status, PMA index, PHP index, KUZ index.

Последовательности 5 ампликонов, предположительно ассоциированные с более сильным поражением легких, полученные при фильтрации по «строгому» порогу воспроизводимости, относились к грамположительным родам типов *Firmicutes* (*Limosilactobacillus*, *Anoxybacillus*, *Mogibacterium*) и *Actinobacteria* (*Atopobium*, *Alloscardovia*). При фильтрации результатов по «умеренному» порогу воспроизводимости дополнительно выявлены 5 ASV, соответствующих таксонам типов *Firmicutes* (*Streptococcus*, *Bulleidia*, *Howardella*) и *Actinobacteria* (*Rothia*), а также роду, относящемуся к типу *Bacteroidetes* (*Alloprevotella*).

На основании данных результатов можно заключить, что ASV, ассоциированные с меньшей степенью поражения легких, в основном относятся к классу грамотрицательных фирмикут (*Negativicutes*), к различным классам протеобактерий, а также к порядку *Fusobacteria*. В свою очередь ASV, ассоциированные с большей степенью поражения легких, относятся преимущественно к грамположительным фирмикутам классов *Bacilli* и *Clostridia*. Следует отметить, что разные ASV, отнесенные к родам *Atopobium* и *Alloprevotella*, находятся в числе ассоциированных как с легкой, так и с тяжелой формами пневмонии у пациентов с COVID-19.

Клиническое наблюдение за отобранной группой пациентов на фоне терапевтического лечения в условиях стационара

В зависимости от характера течения заболевания в период госпитализации включенные в исследование 156 пациентов разделены на 2 группы. Первую группу ($n=70$) составили пациенты со стабильным течением заболевания

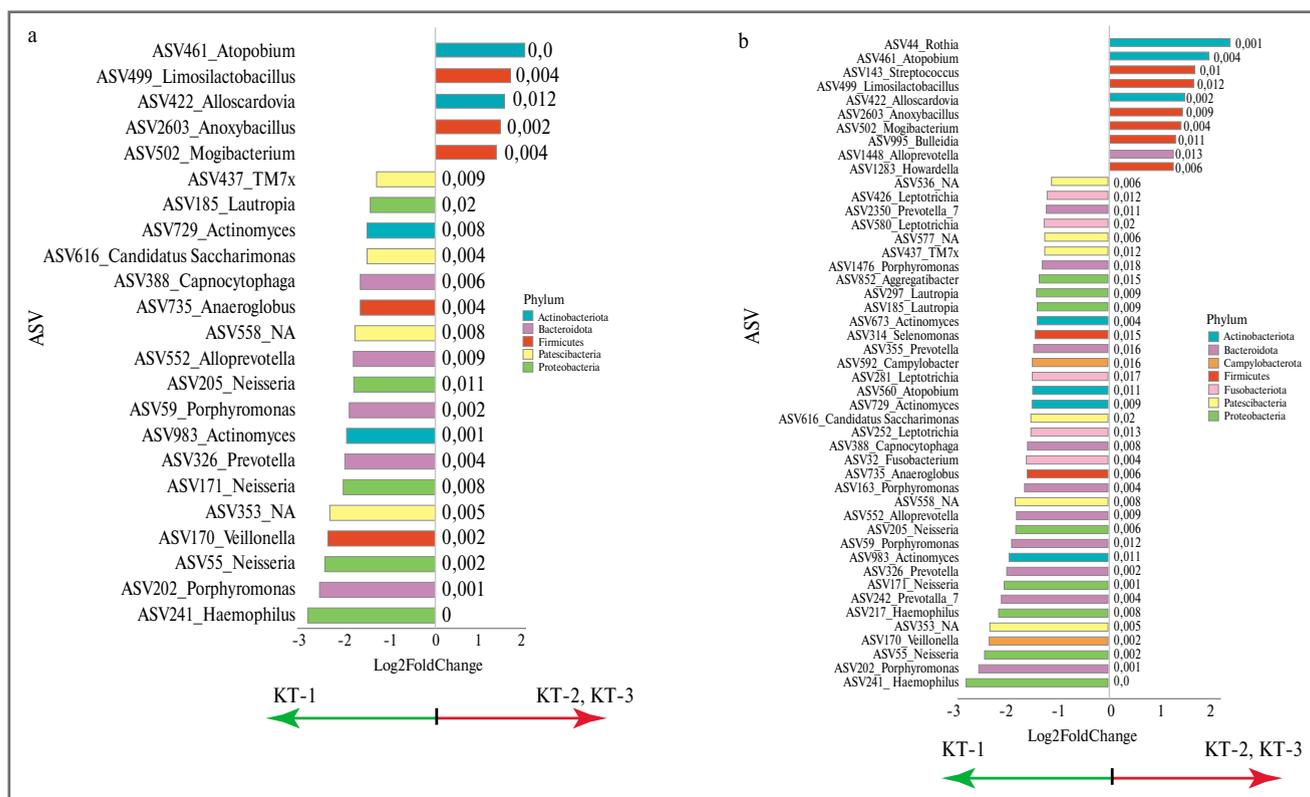


Рис. 6. Анализ дифференциальной представленности 16s ампликонов бактерий, ассоциированных с тяжелой (КТ>2, n=79) и легкой (КТ=1, n=77) степенями поражения легких пациентов. Анализ проводился с использованием метода DeSeq2: а – ASV, воспроизводимые в ≥20 итерациях из 25; б – ASV, воспроизводимые в ≥15 итерациях из 25. ASV бактерий, которые ассоциированы с высокой степенью поражения легких у пациентов, показаны столбиками, направленными вправо; с легкой степенью поражения легких у пациентов – влево. Справа и слева от столбцов отображен уровень статистической значимости (α), рассчитанный в результате анализа для каждого дифференциально представленного ASV.

Fig. 6. Analysis of the differential representation of 16s amplicons of bacteria associated with severe (CT>2, n=79) and mild (CT=1, n=77) degree of lung injury in patients. The analysis was carried out using the DeSeq2 method: a – ASV, reproducible in ≥20 iterations out of 25; b – ASV, reproducing ≥15 iterations out of 25. ASV bacteria that are associated with high lung disease in patients are shown with bars pointing to the right; with a mild degree of lung damage in patients – to the left. To the right and left of the bars is the level of statistical significance (α) calculated from the analysis for each differentially represented ASV.

и положительной динамикой в течение стационарного лечения. Вторая группа (n=86) представлена больными с эпизодами отрицательной динамики течения заболевания в период госпитализации (прогрессирование пневмонии по данным КТ, развитие осложнений заболевания, перевод пациентов в отделение реанимации и интенсивной терапии, летальный исход, клинические состояния, требующие усиления фармакотерапии и применения интервенционных методов лечения, включая дополнительную инсуффляцию кислорода и искусственную вентиляцию легких – ИВЛ).

Сравнительный анализ между группами показал, что в терапии пациентов 2-й группы достоверно более часто использовались антибактериальные препараты, ингибиторы протонной помпы (ИПП), глюкокортикостероиды (ГКС), а также ИВЛ и дополнительная инсуффляция кислородом (табл. 1).

Антибиотикотерапия проводилась в 1-й группе у 11/70 (15,7%) пациентов, муколитики назначены 20/70 (28,6%) пациентам, потребность в дополнительном O₂ выявлена у 16/70 (22,9%) пациентов. Во 2-й группе антибиотики (в том числе комбинированная схема приема) назначены всем 86/86 (100%) пациентам, муколитики – 27/86 (31,4%) пациентам, в дополнительном O₂ нуждались 69/86 (80,2%) паци-

ентов, потребность в подключении к аппарату ИВЛ возникла у 7/86 (8,1%) пациентов. Данные показатели достоверно позволяют считать, что на фоне выраженного ухудшения состояния возникает потребность в купировании отрицательной динамики респираторной системы пациентов.

Назначение антикоагулянтов в 1-й группе отмечено у 64/70 (91,4%) пациентов, а во 2-й – у 82/86 (95,3%) – данные препараты назначаются практически всем пациентам в качестве превентивных мер повышенного тромбообразования и не являются достоверным критерием оценки изменения тяжести состояния. Точно так же с дополнительным назначением ГКС (дексаметазон), где в 1-й группе его назначили 62/70 (88,6%) пациентам и во 2-й группе – 84/86 (97,7%) пациентам – это служит предупредительной мерой развития отечных явлений легких, улучшает дыхательную динамику, тем самым предупреждая развитие осложнений.

Назначение нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) связано с потребностью в снижении температуры тела, общим анализирующим эффектом на фоне возможного появления мышечных и головных болей. Так, в 1-й группе он назначен 28/70 (40%) пациентам, а во 2-й группе – 37/86 (43%) пациентам. Назначение ИПП можно связать с превенцией риска развития НПВС-гастроини-

Таблица 1. Применяемые методы терапии в выделенных группах пациентов**Table 1.** Methods of therapy in selected groups of patients

Параметр, абс. (%)	1-я группа (без отрицательной динамики, n=70; 44,9%)	2-я группа (с отрицательной динамикой, n=86; 55,1%)	p (критерий Фишера)
Антибактериальные препараты (любые)	11 (15,7)	86 (100)	0,000000
Цефтриаксон	8 (11,4)	58 (67,4)	0,000000
Пенициллин	0	22 (25,6)	0,000000
Фторхинолоны	0	11 (12,8)	0,000000
Макролиды	3 (4,3)	8 (9,3)	0,347137
Антикоагулянты (любые)	64 (91,4)	82 (95,3)	0,345555
Эноксапарин	9 (12,9)	21 (24,4)	0,101270
Гепарин	54 (77,1)	62 (72,1)	0,543720
Аторвастатин	1 (1,4)	3 (3,5)	0,628167
ИПП	43 (61,4)	76 (88,4)	0,000118
ГКС	62 (88,6)	84 (97,7)	0,043502
Блокаторы Ca ²⁺ -каналов	4 (5,7)	5 (5,8)	0,999999
β-Адреноблокаторы	10 (14,2)	10 (11,6)	0,638431
НПВС	28 (40,0)	37 (43,0)	0,745697
Противовирусные препараты	32 (45,7)	34 (39,5)	0,515036
Муколитики	20 (28,6)	27 (31,4)	0,728881
Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента	15 (21,4)	15 (17,4)	0,546824
Антагонисты рецепторов альдостерона	6 (8,6)	5 (5,8)	0,543482
Гипогликемические средства	3 (4,3)	6 (6,9)	0,732106
ИВЛ	0 (0)	7 (8,1)	0,000000
Потребность в дополнительной инсуляции кислорода	16 (22,9)	69 (80,2)	0,000000

В 1-й группе ИПП назначались 43/70 (61,4%) пациентам, а во 2-й – 76/86 (88,4%).

Сопоставление данных клинических наблюдений с первичным распределением пациентов на основании КТ легких (табл. 2) продемонстрировало, что в 1-й группе (КТ-1, n=77) незначительно преобладали пациенты без отрицательной динамики в ходе терапии (46/77; 59,7%), тогда как среди пациентов с более тяжелой степенью поражения легких на момент поступления (КТ-2–3, n=79) ожидаемо доминировали пациенты с эпизодами отрицательной динамики в период нахождения в стационаре (56/79; 70,9%).

Таблица 2. Сопоставление тяжести течения COVID-19 с формой пневмонии при поступлении пациентов в стационар**Table 2.** Comparison of the severity of the course of COVID-19 with the form of pneumonia upon admission of patients to the hospital

	КТ-1 (n=77)	КТ-2, КТ-3 (n=79)	Итого
Без отрицательной динамики (n=70)	46	24	70
С отрицательной динамикой (n=86)	31	55	86
Итого	77	79	156

Обсуждение

В данном исследовании мы рассмотрели возможную связь между микробиотой ротоглотки и развитием пневмонии на фоне COVID-19 и выявили ряд таксонов, предположительно ассоциированных с высокой и низкой степенью поражения легких.

В исследовании намеренно включены мазки ротоглотки от пациентов с COVID-19, отобранные при их поступлении в стационар: такой подход позволил исключить потенциальное присоединение инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, позволяя рассматривать развившуюся у пациентов пневмонию как внебольничную.

Согласно нашим данным, с высокой степенью поражения легких ассоциирован ряд последовательностей, относящихся к грамположительным фирмикутам классов *Bacilli* и *Clostridia*, в числе которых последовательности рода *Mogibacterium*. Для данного микроорганизма, ранее выделявшегося из образцов пациентов с респираторными инфекциями, в недавнем исследовании показана провоспалительная активность *in vitro* [9].

С меньшей степенью поражения легких ассоциирован ряд последовательностей, относящихся к грамотрицательным фирмикутам (*Negativicutes*), протеобактериям и к порядку *Fusobacteria* (в частности, к роду *Leptotrichia*).

Представленность как протеобактерий, так и *Leptotrichia* и *Haemophilus* у пациентов с меньшей степенью поражения легких можно предположительно связать с сиаловыми кислотами, находящимися на поверхностях клеток данных бактерий. Сиаловые кислоты поверхностей эпителиальных клеток человека являются дополнительной мишенью для связывания вирусных частиц SARS-CoV-2 помимо ACE2 рецептора [10]. Протеобактерии и *Fusobacteria*, к которым относится род *Leptotrichia*, способны к синтезу сиаловых кислот *de novo*, в то время как бактерии рода *Haemophilus*, которые также ассоциированы с меньшей степенью поражения легких, катаболизируют сиаловые кислоты с поверхности клеток человека [11]. Ранее высказывалось предположение, что бактерии верхних дыхательных путей, имеющие на своей поверхности сиаловые кислоты, могут выполнять барьерную функцию, являясь конкурентной мишенью для связывания SARS-CoV-2, что приводит к снижению вирусной нагрузки на нижние дыхательные пути [12]. Это может быть одним из объяснений обнаруженной нами ассоциации бактерий родов *Leptotrichia* и *Haemophilus* с более легким течением болезни.

О сниженной представленности рода *Leptotrichia* в носоглотке больных COVID-19 уже неоднократно сообщалось ранее [13, 14], при этом для данной бактерии показана положительная корреляция с метиловым эфиром хлорогеновой кислоты [14]. Исследователи предполагали, что данное соединение, предположительно производимое комменсальными микроорганизмами рода *Leptotrichia*, может играть роль в защите организма от проявлений COVID-19 [14]. В одном из предшествующих исследований для данного метаболита показана противовоспалительная активность на животной модели воспаления легких, осуществляющаяся за счет регуляции сигнального пути COX-2/NLRP3/NF-κB [15].

Несколько ASV, ассоциированных с меньшей степенью поражения легких, относятся к недавно выделенному филуму эубионтов *Saccharibacteria* (также известному как TM7), а также к актинобактериям, в том числе *Actinomyces* и *Schaalia*, предположительно являющихся базобионтами (хозяевами) данных бактерий. Роль бактерий филума TM7 в организме человека до конца не определена. Ранее их ассоциировали с дисбиотическими микробиомами, выделяемыми у пациентов с периодонтитом [16]. Однако в недавнем исследовании *in vivo* показано, что TM7 способны регулировать патогенность актинобактерий-хозяев, тем самым снижая вызванный их активностью воспалительный ответ [17]. Это согласуется с данными другого исследования *in vitro*, в котором ассоциированные с хозяином TM7х способны снижать в макрофагах экспрессию фактора некроза опухоли α, вызванную активностью бактерии-хозяина [18]. На основе этого наблюдения высказывалось предположение, что TM7 способны регулировать иммунный ответ в организме человека [18, 19]. На настоящий момент понимание роли TM7 в микробиоте дыхательных путей и ротовой полости затруднено, в том числе ввиду ограниченности информации о спектре предположительных хозяев данных эубионтов.

Ретроспективный анализ клинических данных показал, что среди пациентов, имевших легкую форму пневмонии при поступлении в стационар (группа КТ-1, n=76), в большинстве случаев (46/76; 60,5%) за время пребывания в стационаре не наблюдалось отрицательной динамики, тогда как в группе пациентов с более тяжелыми формами пневмонии (группа КТ-2-3, n=80) таких случаев значительно

меньше (24/80; 30%). Однако обращает на себя внимание тот факт, что в обеих группах встречались пациенты с отрицательной динамикой во время пребывания в стационаре, что еще раз подчеркивает сложность прогнозирования клинического исхода COVID-19. В последующих исследованиях предстоит выяснить, насколько наблюдаемые отличия в картине течения болезни обусловлены составом микробиоты ротоглотки.

Заключение

На основании как полученных нами результатов, так и литературных данных можно предположить два механизма, посредством которых микробиота ротоглотки может оказывать влияние на течение вирусных респираторных инфекций, в частности вызванной SARS-CoV-2: образование «барьера», позволяющего задерживать вирусные частицы и таким образом снижать вирусную нагрузку на нижние дыхательные пути, а также модуляция иммунного ответа за счет регуляции экспрессии как про-, так и противовоспалительных цитокинов.

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

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Эта работа была поддержана грантом РНФ №21-15-00431 и ГЗ №ЕГИСУ НИОКТР 122040100011-0.

Список сокращений

ГКС – глюкокортикостероиды
ИВЛ – искусственная вентиляция легких
ИПП – ингибиторы протонной помпы
КПУ – индекс количественного показателя кариозных, пломбированных и удаленных зубов
КТ – компьютерная томография
НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
ASV (amplicon sequence variants) – последовательность ампликонов
NMDS (Non-Metric Multidimensional Scaling) – неметрическое многомерное шкалирование
РНП – индекс эффективности гигиены
РМА – папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, et al. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):120. DOI:10.1186/s12866-020-01801-y
- Pace CC, McCullough GH. The association between oral microorganisms and aspiration pneumonia in the institutionalized elderly: review and recommendations. *Dysphagia.* 2010;25(4):307-22. DOI:10.1007/s00455-010-9298-9
- Mammen MJ, Scannapieco FA, Sethi S. Oral-lung microbiome interactions in lung diseases. *Periodontol 2000.* 2020;83(1):234-41. DOI:10.1111/prd.12301
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13(7):581-3. DOI:10.1038/nmeth.3869
- Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, et al. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome.* 2018;6(1):226. DOI:10.1186/s40168-018-0605-2
- McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: a bioconductor package for handling and analysis of high-throughput phylogenetic sequence data. *Pac Symp Biocomput.* 2012:235-46.

7. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. DOI:10.1186/s13059-014-0550-8
8. Castro-Nallar E, Bendall ML, Pérez-Losada M, et al. Composition, taxonomy and functional diversity of the oropharynx microbiome in individuals with schizophrenia and controls. *PeerJ.* 2015;3:e1140. DOI:10.7717/peerj.1140
9. Li Q, Pu Y, Lu H, et al. Porphyromonas, Treponema, and Mogibacterium promote IL8/IFN γ /TNF α -based pro-inflammation in patients with medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Microbiol.* 2021;13(1). DOI:10.1080/20002297.2020.1851112
10. Nguyen L, McCord KA, Bui DT, et al. Sialic acid-containing glycolipids mediate binding and viral entry of SARS-CoV-2. *Nat Chem Biol.* 2022;18(1):81-90. DOI:10.1038/s41589-021-00924-1
11. Bouchet V, Hood DW, Li J, et al. Host-derived sialic acid is incorporated into Haemophilus influenzae lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(15):8898-903. DOI:10.1073/pnas.1432026100
12. Honarmand Ebrahimi K. SARS-CoV-2 spike glycoprotein-binding proteins expressed by upper respiratory tract bacteria may prevent severe viral infection. *FEBS Lett.* 2020;594(11):1651-60. DOI:10.1002/1873-3468.13845
13. Nardelli C, Gentile I, Setaro M, et al. Nasopharyngeal Microbiome Signature in COVID-19 Positive Patients: Can We Definitively Get a Role to Fusobacterium periodonticum? *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:625581. DOI:10.3389/fcimb.2021.625581
14. Liu J, Liu S, Zhang Z, et al. Association between the nasopharyngeal microbiome and metabolome in patients with COVID-19. *Synth Syst Biotechnol.* 2021;6(3):135-43. DOI:10.1016/j.synbio.2021.06.002
15. Zhang L, Fan Y, Su H, et al. Chlorogenic acid methyl ester exerts strong anti-inflammatory effects via inhibiting the COX-2/NLRP3/NF- κ B pathway. *Food Funct.* 2018;9(12):6155-64. DOI:10.1039/c8fo01281d
16. Brinig MM, Lepp PW, Ouverney CC, et al. Prevalence of bacteria of division TM7 in human subgingival plaque and their association with disease. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(3):1687-94. DOI:10.1128/AEM.69.3.1687-1694.2003
17. Chipashvili O, Utter DR, Bedree JK, et al. Episymbiotic Saccharibacteria suppresses gingival inflammation and bone loss in mice through host bacterial modulation. *Cell Host Microbe.* 2021;29(11):1649-62.e7. DOI:10.1016/j.chom.2021.09.009
18. He X, McLean JS, Edlund A, et al. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(1):244-9. DOI:10.1073/pnas.1419038112
19. Bor B, Bedree JK, Shi W, et al. Saccharibacteria (TM7) in the Human Oral Microbiome. *J Dent Res.* 2019;98(5):500-9. DOI:10.1177/0022034519831671

Статья поступила в редакцию / The article received: 28.04.2022



OMNIDOCTOR.RU