doi 10.18699/bgrs2026-48

Анализ разнообразия бактериофагов и их бактериальных хозяев в метагеномах кишечника здоровых людей и пациентов с ВИЧ-2 инфекцией

Ерочкина С.[1]*, Сучко П.[2], Дудурич В.[3], Глотов О.[4], Данилов Л.[1, 2]
[1] *Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия*
[2] *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*
[3] *ООО «Сербалаб», Санкт-Петербург, Россия*
[4] *«Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства России», Санкт-Петербург, Россия;*
** erochkinas@bk.ru*

Ключевые слова: ВИЧ-2; микробиом кишечника; бактериофаги; бактерии

Мотивация и цель: Инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека типа 2 (ВИЧ-2), характеризуется более медленным прогрессированием заболевания и меньшей вирулентностью по сравнению с ВИЧ-1, однако до сих пор остаётся значительно менее изученной. Несмотря на относительно благоприятный клинический прогноз, ВИЧ-2-инфекция также приводит к нарушениям иммунного статуса, хроническому воспалению и изменениям в составе кишечной микробиоты [1, 2]. Эти изменения могут способствовать нарушению барьерной функции кишечника и поддержанию системного воспаления. Бактериофаги, как один из компонентов вирусной части микробиома, играют важную роль в регуляции бактериальных популяций, горизонтальном переносе генов и модуляции микробного сообщества. В настоящее время данные о структуре и разнообразии фагового сообщества кишечника при ВИЧ-2-инфекции практически отсутствуют.

Цель настоящего исследования заключалась в комплексном анализе кишечного микробиома здоровых людей и пациентов с ВИЧ-2-инфекцией с акцентом на сборку геномов бактериофагов, оценку их альфа- и бета-разнообразия, а также количественную характеристику потенциальных бактериальных хозяев.

Методы и алгоритмы: Для анализа были использованы метагеномные данные 15 образцов фекалий: 10 от здоровых доноров и 10 от пациентов с подтвержденной инфекцией ВИЧ-2. Все последовательности получены на платформе высокопроизводительного секвенирования DNBSEQ-G400.

Контроль качества прочтений и их фильтрацию проводили с помощью программы fastp (v. 0.20.1) с параметрами по умолчанию (обрезка адаптеров, удаление низкокачественных прочтений и коротких фрагментов). Сборка контигов выполнялась с помощью программы MEGAHIT (v. 1.2.9) в мета-режиме с оптимизированными параметрами для метагеномов большого размера.

Поиск и выделение вирусных последовательностей осуществляли с использованием комплекса специализированных инструментов: VirSorter (v. 1.0.6), VirFinder (v. 1.1), Phigaro (v. 2.3.0), VIBRANT (v. 1.2.0) и geNomad (v. 1.11.2). Дерепликацию полученных вирусных геномов проводили с помощью CD-HIT (v. 4.8.1) при пороге идентичности 95 % и покрытии 80 %. Таксономическую классификацию бактериофагов и предсказание их бактериальных хозяев выполняли с помощью базы данных и инструментария UHGV (Unified Human Gut Virome) (v. 0.0.1). [3] Оценку численности бактерий и фагов проводили путём выравнивания исходных отфильтрованных прочтений на объединённый каталог: референсный каталог геномов бактерий кишечника человека и de novo собранные и аннотированные геномы бактериофагов. Выравнивание выполнено с помощью Bowtie2 (v. 2.4.2) последующим подсчетом покрытия и нормализацией на длину контига и глубину секвенирования.

Статистический анализ данных проведен в среде R (v. 4.5.2). Матрицы обилий обработаны с помощью пакетов vegan (v. 2.7.) (расчет α-разнообразия Shannon, Simpson и richness, PERMANOVA на основе расстояния Брэя–Кертиса, NMDS), MASS (v. 7.3) (линейный дискриминантный анализ, LDA), dplyr (v. 1.2.0) и tidyr (v. 1.3.2) (подготовка данных), ggplot2 (v. 4.0.2) (визуализация) и pheatmap (v. 1.0.13) (тепловые карты). Сравнение групп проводилось с помощью теста Вилкоксона с коррекцией на множественное тестирование (Benjamini–Hochberg). Уровень значимости принимали равным 0,05.

Результаты: Анализ альфа-разнообразия выявил значительное снижение разнообразия как бактериофагов, так и бактериальной микробиоты кишечника у пациентов с ВИЧ-2-инфекцией по сравнению со здоровыми донорами. Индекс Шеннона для бактериофагов был статистически значимо ниже в группе ВИЧ-2 (Wilcoxon rank sum test, $W = 50$, $p = 0{,}002671$). Аналогичный результат получен для бактериальной компоненты микробиома ($W = 48$, $p = 0{,}002664$).

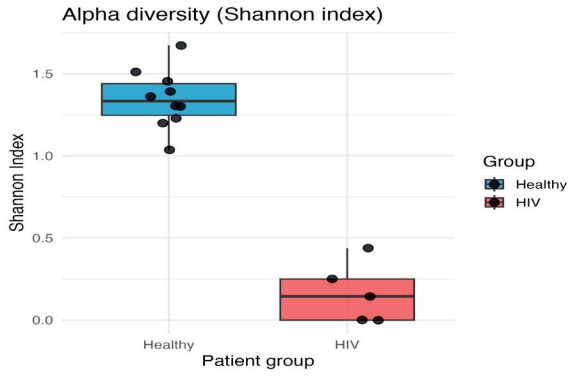


Рисунок 1. У пациентов с ВИЧ-2 инфекцией снижено биоразнообразие бактериофагов.

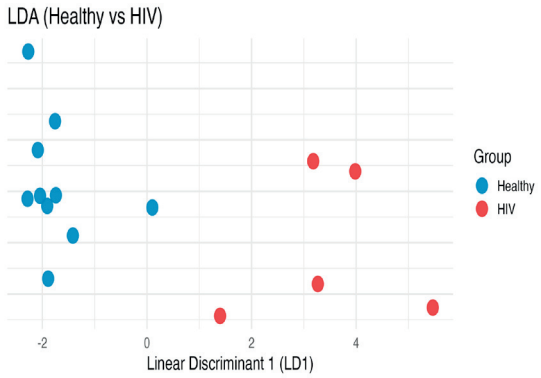


Рисунок 2. LDA нагрузки.

PERMANOVA-анализ бета-разнообразия (расстояние Брэя–Кёртиса, 9999 пермутаций) подтвердил высоко значимые различия в структуре сообществ между группами. Для бактериофагов фактор «группа» объяснял 32,17 % дисперсии ($F = 6,17$, $p = 0,001$). Для бактериальной микробиоты вклад фактора был ещё выше – 36,55 % ($F = 7,49$, $p = 0,0003$). При использовании различных ординаций (NMDS и LDA) можно было наблюдать чёткое разделение образцов по группам «здоровые» и «ВИЧ-2».

У пациентов с ВИЧ-2 значительно увеличивалось относительное обилие родов, часто связанных с воспалительными процессами, оппортунистическими инфекциями и транслоцирующимися из полости рта в кишечник. Наиболее выраженное обогащение ($log_2FC > 2$, $p_adj < 0,01$) отмечено для следующих родов: *Leptotrichia*, *Enterobacter*, *Porphyromonas*, *TM7x*, *Staphylococcus*, *Rothia*, *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*, *Actinomyces*, *Neisseria*, *Limosilactobacillus* и *Lactobacillus*. При дисбиозе на фоне ВИЧ-инфекции обогащение таких родов, как *Staphylococcus*, *Porphyromonas* и *Enterobacter*, запускает хроническое воспаление через три ключевых механизма: стафилококки активируют TLR2 с выбросом TNF-α и IL-6, порфиромонады блокируют апоптоз нейтрофилов, вызывая их некроз и повреждение тканей, а энтеробактеры поставляют липополисахарид, который через TLR4 и NLRP3-инфламмасому стимулирует гиперпродукцию IL-1β и IL-18. Совместное действие этих процессов ведет к повышенной проницаемости кишечника и дальнейшему иммунному дисбалансу даже при относительно медленном течении ВИЧ-2-инфекции.

Одновременно у здоровых доноров преобладали типичные представители облигатной анаэробной микробиоты, обилие которых было существенно снижено при ВИЧ-2-инфекции. [4]

Выводы: Проведенное исследование выявило выраженные нарушения микробиоценоза кишечника у пациентов с ВИЧ-2-инфекцией, характеризующиеся значительной перестройкой таксономической структуры сообщества. Установлено, что на фоне ВИЧ-2-инфекции происходит достоверное увеличение относительного обилия родов, ассоциированных с воспалительными процессами, оппортунистическими инфекциями и потенциальной транслокацией из ротовой полости в кишечник. Наиболее значимое обогащение ($log_2FC > 2$, $p_adj < 0,01$) зафиксировано для таксонов *Leptotrichia*, *Enterobacter*, *Porphyromonas*, *TM7x*, *Staphylococcus*, *Rothia*, *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*, *Actinomyces*, *Neisseria*, *Limosilactobacillus* и *Lactobacillus*. В противоположность этому, у здоровых доноров доминировали представители облигатной анаэробной микробиоты, тогда как при ВИЧ-2-инфекции их относительное обилие было существенно снижено. Выявленные изменения указывают на формирование дисбиотического профиля, ассоциированного с утратой метаболически активных комменсалов и колонизацией микробов с потенциально провоспалительными свойствами, что может вносить вклад в патогенез иммунной дисфункции при ВИЧ-2-инфекции.

Analysis of bacteriophage and their bacterial host diversity in gut metagenomes of healthy individuals and patients with HIV-2 infection

Erochkina S.[1]*, Suchko P.[2], Dudurich V.[3], Glotov O.[4], Danilov L.[1, 2]
[1] *Sirius University of Science and Technology, federal territory "Sirius", Russia*
[2] *Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia*
[3] *Cerbalab LLC, Saint-Petersburg, Russia*
[4] *Federal State Budgetary Institution "Federal Scientific and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical and Biological Agency", Saint-Petersburg, Russia*
** erochkinas@bk.ru*

Key words: HIV-2; gut microbiome; bacteriophages; bacteria

Motivation and Aim: Infection with human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) is characterized by slower disease progression and lower virulence compared to HIV-1; however, it remains significantly less studied. Despite a relatively

favorable clinical prognosis, HIV-2 infection also leads to impairments in immune status, chronic inflammation, and alterations in the composition of the gut microbiota [1, 2]. These changes may contribute to disruption of the intestinal barrier function and the maintenance of systemic inflammation. Bacteriophages, as a component of the viral fraction of the microbiome, play an important role in regulating bacterial populations, horizontal gene transfer, and modulating the microbial community. Currently, data on the structure and diversity of the gut phage community in HIV-2 infection are virtually absent. The aim of this study was a comprehensive analysis of the gut microbiome in healthy individuals and patients with HIV-2 infection, focusing on the assembly of bacteriophage genomes, assessment of their alpha- and beta-diversity, and quantitative characterization of potential bacterial hosts.

Methods and Algorithms: For the analysis, metagenomic data from 15 fecal samples were used: 10 from healthy donors and 10 from patients with confirmed HIV-2 infection. All sequences were obtained using the DNBSEQ-G400 high-throughput sequencing platform.

Read quality control and filtering were performed using fastp (v. 0.20.1) with default parameters (adapter trimming, removal of low-quality reads and short fragments). Contig assembly was carried out using MEGAHIT (v. 1.2.9) in meta-mode with optimized parameters for large metagenomes.

Viral sequence identification and extraction were performed using a suite of specialized tools: VirSorter (v. 1.0.6), VirFinder (v. 1.1), Phigaro (v. 2.3.0), VIBRANT (v. 1.2.0), and geNomad (v. 1.11.2). Dereplication of the obtained viral genomes was conducted using CD-HIT (v. 4.8.1) with a 95 % identity threshold and 80 % coverage.

Taxonomic classification of bacteriophages and prediction of their bacterial hosts were performed using the UHGV (Unified Human Gut Virome) database and toolkit (v. 0.0.1). [3] Quantification of bacteria and phages was carried out by aligning the original filtered reads against a combined catalog: a reference catalog of human gut bacterial genomes and de novo assembled and annotated bacteriophage genomes. Alignment was performed using Bowtie2 (v. 2.4.2), followed by coverage calculation and normalization by contig length and sequencing depth.

Statistical analysis of the data was performed in the R environment (v. 4.5.2). Abundance matrices were processed using the following packages: vegan (v. 2.7) (calculation of Shannon, Simpson, and richness alpha-diversity indices, PERMANOVA based on Bray–Curtis distance, NMDS), MASS (v. 7.3) (linear discriminant analysis, LDA), dplyr (v. 1.2.0) and tidyr (v. 1.3.2) (data preparation), ggplot2 (v. 4.0.2) (visualization), and pheatmap (v. 1.0.13) (heatmaps). Group comparisons were performed using the Wilcoxon test with correction for multiple testing (Benjamini–Hochberg). The significance level was set at 0.05.

Results: Alpha diversity analysis revealed a significant decrease in the diversity of both bacteriophages and the bacterial gut microbiota in patients with HIV-2 infection compared to healthy donors. The Shannon index for bacteriophages was statistically significantly lower in the HIV-2 group (Wilcoxon rank sum test, W = 50, p = 0.002671). A similar result was obtained for the bacterial component of the microbiome (W = 48, p = 0.002664).

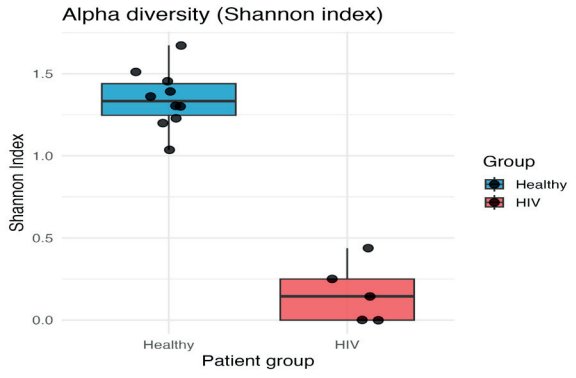


Figure 1. Bacteriophage biodiversity is reduced in patients with HIV-2 infection.

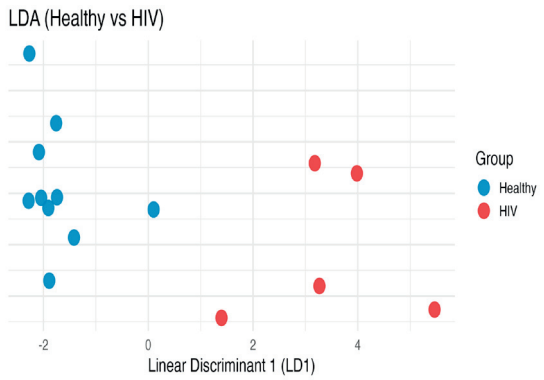


Figure 2. LDA loadings.

PERMANOVA analysis of beta diversity (Bray–Curtis distance, 9999 permutations) confirmed highly significant differences in community structure between the groups. For bacteriophages, the "group" factor explained 32.17 % of the variance (F = 6.17, p = 0.001). For the bacterial microbiota, the contribution of the factor was even higher – 36.55 % (F = 7.49, p = 0.0003). Using different ordination methods (NMDS and LDA), a clear separation of samples into "healthy" and "HIV-2" groups could be observed.

In patients with HIV-2, the relative abundance of genera frequently associated with inflammatory processes, opportunistic infections, and oral-to-gut translocation was significantly increased. The most pronounced enrichment ($log_2FC > 2$, $p_adj < 0.01$) was observed for the following genera: *Leptotrichia*, *Enterobacter*, *Porphyromonas*, *TM7x*, *Staphylococcus*, *Rothia*, *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*, *Actinomyces*, *Neisseria*, *Limosilactobacillus*, and *Lactobacillus*. In dysbiosis associated with HIV infection, enrichment of genera such as *Staphylococcus*, *Porphyromonas*, and *Enterobacter* triggers chronic inflammation through three key mechanisms: staphylococci activate TLR2 with release of TNF-α and IL-6; *Porphyromonas* species block neutrophil apoptosis, causing their necrosis

and tissue damage; and enterobacteria provide lipopolysaccharide, which via TLR4 and the NLRP3 inflammasome stimulates hyperproduction of IL-1β and IL-18. The combined action of these processes leads to increased intestinal permeability and further immune imbalance, even in the relatively slow course of HIV-2 infection.

Simultaneously, typical representatives of the obligate anaerobic microbiota, whose abundance was substantially reduced in HIV-2 infection, predominated in healthy donors [4].

Conclusion: This study revealed pronounced disturbances in the intestinal microbiocenosis of patients with HIV-2 infection, characterized by a significant restructuring of the taxonomic composition of the community. It was established that, in the context of HIV-2 infection, there is a significant increase in the relative abundance of genera associated with inflammatory processes, opportunistic infections, and potential translocation from the oral cavity to the intestine. The most significant enrichment ($log_2FC > 2$, $p_adj < 0.01$) was recorded for the taxa Leptotrichia, Enterobacter, Porphyromonas, TM7x, Staphylococcus, Rothia, Cutibacterium, Corynebacterium, Anaerococcus, Actinomyces, Neisseria, Limosilactobacillus, and Lactobacillus.

In contrast, representatives of the obligate anaerobic microbiota dominated in healthy donors, whereas their relative abundance was substantially reduced in HIV-2 infection. The observed changes indicate the formation of a dysbiotic profile associated with the loss of metabolically active commensals and the colonization of microbes with potentially pro-inflammatory properties, which may contribute to the pathogenesis of immune dysfunction in HIV-2 infection.

Funding: This work was supported by the grant of the state program of the «Sirius» Federal Territory "Scientific and technological development of the «Sirius» Federal Territory" (Agreement No. 3-03 dated 18.09.2025).

Список литературы/References

1. Ishizaka, A., et al. (2024). «Thiamine deficiency underlies persistent gut dysbiosis and inflammation in people living with HIV on antiretroviral therapy.»
2. Jabbar KS, Priya S, Xu J, Das Adhikari U, Pishchany G, Mohamed ATM, Johansen J, Thurimella K, McCabe C, Vlamakis H, Okello S, Delorey TM, Lankowski A, Mosepele M, Siedner MJ, Plichta DR, Kwon DS, Xavier RJ. Human immunodeficiency virus and antiretroviral therapies exert distinct influences across diverse gut microbiomes. Nat Microbiol. 2025 Nov;10(11):2720-2735. doi: 10.1038/s41564-025-02157-7. Epub 2025 Oct 30. PMID: 41168431.
3. Almeida, A., Nayfach, S., Boland, M. et al. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. Nat Biotechnol 39, 105–114 (2021). https://doi.org/10.1038/s41587-020-0603-3
4. Ishizaka A, Koga M, Mizutani T, Parbie PK, Prawisuda D, Yusa N, Sedohara A, Kikuchi T, Ikeuchi K, Adachi E, Koibuchi T, Furukawa Y, Tojo A, Imoto S, Suzuki Y, Tsutsumi T, Kiyono H, Matano T, Yotsuyanagi H. Unique Gut Microbiome in HIV Patients on Antiretroviral Therapy (ART) Suggests Association with Chronic Inflammation. Microbiol Spectr. 2021