

Неизвестные возбудители заболеваний в микрофлоре ротовой полости человека, актуальные для оториноларингологии

Д.м.н., проф. В.В. ТЕЦ*, к.м.н. Г.В. ТЕЦ, врач Д.С. ВИКИНА, врач М.Ф. ВЕЧЕРКОВСКАЯ, В.В. ХАРЛАМОВА

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии (зав. — проф. В.В. Тец) Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова

Unknown pathogens from the human oral microflora of interest for otorhinolaryngology

V.V. TETS, G.V. TETS, D.S. VIKINA, M.F. VECHERKOVSKAYA, V.V. KHARLAMOVA

I.P. Pavlov St.-Petersburg State Medical University

Цель работы — выделение и идентификация в нормальной микрофлоре ротовой полости малоизученных или неизвестных ранее аэробных условно-патогенных бактерий, которые могут вызвать поражение различных ЛОР-органов. Нормальная микрофлора остается малоизученной, что связано с отсутствием методов культивирования, обеспечивающих выделение чистых культур этих микробов. В настоящем исследовании впервые показано выделение устойчивых смешанных микробных биопленок, образованных неродственными бактериями и содержащих ранее не известные бактерии. Из смешанных биопленок выделены и идентифицированы малоизученные и не известные ранее аэробные условно-патогенные бактерии, способные вызывать заболевания ЛОР-органов, и изучена их чувствительность к антибиотикам.

Ключевые слова: смешанные биопленки, малоизученные бактерии, «пока не культивируемые» бактерии, условно-патогенные бактерии, микробиота ротовой полости.

The identification of microorganisms from the human oral cavity is a topical problem in many clinical disciplines including otorhinolaryngology. Many bacterial species of oral microbiota are causative agents of ENT diseases, and poor conditions of the oral cavity, unhealthy teeth and gums increase the risk of the spread of infection. The objective of the present study was to distinguish and identify poorly explored and previously unknown aerobic opportunistic pathogenic microorganisms responsible for various ENT disorders. The normal microflora remains to be thoroughly studied with the use of the new culturing techniques that ensure the isolation of pure microbial cultures. The present publication reports for the first time isolation of the stable mixed microbial biofilms formed by unrelated bacterial species and containing the yet unknown microorganisms. The isolated bacteria were identified as previously unknown or poorly unexplored anaerobic opportunistic species capable of inducing ENT pathology; their sensitivity to antibiotics was evaluated.

Key words: mixed biofilms, poorly explored bacteria, still uncultivable bacteria, opportunistic pathogenic bacteria, oral cavity microbiota.

Бактерии, представленные в составе нормальной микрофлоры, играют важную роль в возникновении патологических процессов различной локализации [1]. Сохранение и распространение среди этих бактерий генов антибиотикоустойчивости потребовало детального изучения и идентификации состава нормальной микрофлоры человека (микробиоты).

Известно, что представители микрофлоры ротовой полости являются возбудителями заболеваний ЛОР-органов [2]. Плохое состояние полости рта, болезни зубов и десен увеличивают риск возникновения поражений различных органов. Пародонтит служит причиной возникновения фарингита, тонзиллита, паратонзиллярных абсцессов и ринита [3, 4].

Бактерии, обитающие в организме человека, несмотря на очевидную значимость для медицины, остаются недостаточно изученными. Считается, что идентифици-

ровано от 5 до 30% микроорганизмов нормальной микрофлоры. Трудности в изучении микробиоты связаны с отсутствием методов культивирования большинства бактерий. Согласно нашим данным, это связано с организацией жизни бактерий в составе устойчивых сообществ — биопленок, которая подразумевает гораздо большую взаимозависимость микроорганизмов и создает им условия, пока не воспроизводимые в лаборатории [5–8]. Изучение генов микробиоты показало, что неизученными и практически не известными являются различные бактерии, археи, грибы и вирусы, получившие обозначение «пока не культивируемые».

Цель настоящей работы — выделение и идентификация в нормальной микрофлоре ротовой полости малоизученных или не известных ранее аэробных условно-патогенных бактерий, которые могут вызвать поражение различных ЛОР-органов.

© Коллектив авторов, 2014

© Вестник оторинолар., 2014

*e-mail: vtetv@yahoo.com

Материал и методы

Материал для исследования: слюна людей в возрасте от 19 до 60 лет. Слюну собирали в стерильные пробирки и в течение 1 ч после забора материала делали высевы.

Культивирование. Для выделения бактерий использовали жидкие и агаризованные питательные среды: брусчатка агар, эндо, кровяной агар, агаризованная среда LB (bioMerie). Колонии анализировали по характеру роста, морфологии и изменениям свойств среды. Для изучения бактерий использованы методы окраски по Граму и световой микроскопии: микроскоп Olympus BX51TF (Japan); Digital Microscope Camera ProgRes CF. Программа для компьютера — ProgRes MACSCaptureProVersion 2.7.6 Jenoptic (Germany), Camera adapter (Projectionlens) U-TV0.63X-C, SensorCCD, Color 2/3". Чистые культуры идентифицировали по биохимической активности с помощью автоматической системы Vitec-2 (BioMerie). Чувствительность к антибиотикам определяли с использованием панели Vitec-2 (BioMerie).

Метод выделения ДНК и сиквенс

Выделение ДНК проводили фенол-хлороформным методом [9]. Нуклеотидную последовательность генов определяли с использованием набора для термоциклического секвенирования BigDyeTMTerminatorv.3.1 Cycle Sequencing («Applied Biosystem», США) согласно рекомендациям производителя. Продукты реакции анализировали с использованием автоматического секвенатора ABIPrismGeneticAnalyzer 3730XL («Applied Biosystem», США, «Hitachi», Япония). Конверсию исходных хроматографических данных в формат *.txt и *.AB осуществляли с использованием программного пакета Sequencing Analysis 5.3.1 («Applied Biosystems», США). Анализ данных осуществляли с использованием программного пакета Sequence Scanner («Applied Biosystems», США).

Дерево строили с использованием программы ARB [10].

Результаты и обсуждение

Высевы исследуемого материала использованным методом позволили получить смешанные биопленки, напоминающие обычные колонии, образованные бактериями одного вида (рис. 1 на цв. вклейке). Каждая из них включала от 2 до 8 различных бактерий (рис. 2 на цв. вклейке). Все представленные на снимках «колонии» представляют собой смешанные бактериальные биопленки, включающие грамположительные и грамотрицательные бактерии. Чистые бактериальные культуры в использованных условиях в первом высеве практически не были обнаружены.

По организации выявленные биопленки идентичны смешанным микробным сообществам, полученным нами ранее экспериментально [11, 12].

В результате расщепов на разные среды часть смешанных биопленок удалось разделить и получить из них чистые культуры бактерий, пригодные для идентификации. В то же время большинство смешанных биопленок разделить в использованных условиях не удалось. Они оказались устойчивыми сообществами, которые выдерживали многократные (больше 10) пересевы на аналогичные среды. Образование на питательных средах большого числа разнообразных смешанных биопленок свидетельствует о существовании в микробиоте тесного взаимодействия

между различными неродственными бактериями. Устойчивое воспроизведение смешанных бактериальных биопленок и невозможность получения на использованных средах чистых культур указывает на выраженный мутуализм бактерий нормальной микрофлоры. В этом типе взаимодействия каждая из бактерий дает другой какие-то факторы, которые сам получатель синтезировать не может. Очевидно, что эти факторы отсутствуют и в использованных нами питательных средах.

Часть бактерий, изолированных из смешанных биопленок в виде чистых культур и идентифицированных по биохимическим тестам, с достоверностью 98–99% принадлежат к известным родам и видам, представители которых являются возбудителями заболеваний человека различной локализации. Вместе с тем они не описаны или малоизвестны как представители нормальной микрофлоры ротовой полости человека.

Среди грамположительных бактерий обнаружен *Aerococcus viridans*, микроорганизм, относящийся к возбудителям оппортунистических инфекций. Известны некоторые заболевания, которые может вызвать *A. viridans*: менингит, инфекции мочевыводительной системы и эндокардит у детей и взрослых, септический артрит и бактериемия. Данный микроорганизм способен распространяться в госпиталях и считается возбудителем внутрибольничных (нозокомиальных) инфекций [13]. Другими грамположительными бактериями оказались различные стафилококки: недавно обнаруженные в ротовой полости *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis* и *Staphylococcus warneri*, [14], а также *Staphylococcus pasteurii* и *S. hominis* spp. *novobiosepticus*, которые ранее в слюне практически не выявлялись. Все эти кокки относятся к возбудителям оппортунистических и нозокомиальных инфекций [15]. Среди стафилококков, выделенных в смешанных биопленках из ротовой полости, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* характеризуется выраженной устойчивостью к новобиоцину, налидиксовой кислоте, пенициллину, оксацилину, канамицину и стрептомицину. Известно, что у этого вида также часто встречаются штаммы, устойчивые к эритромицину, клиндамицину, клорамфениколу, сульфаниламидам и ципрофлоксацину [16]. Устойчивость к азалидам (азитромицин), макролидам (эритромицин) и клиндамицину показал *S. hominis*. Другой стафилококк, ранее не описанный в микрофлоре ротовой полости — *Staphylococcus pasteurii* показал устойчивость к эритромицину.

Из слюны были также изолированы чистые культуры грамотрицательных аэробных бактерий. Так, была идентифицирована *Pseudomonas putida*, известная как представитель микрофлоры воды, почвы и некоторых животных [17]. Описаны случаи заболеваний людей, вызванные *P. putida*, однако в составе нормальной микрофлоры человека эта бактерия ранее не описана. Другая выявленная псевдомонада — *Pseudomonas oryzihabitans* — обитает в сточных водах и недавно была обнаружена на поверхности языка [18]. Грамотрицательная бактерия *Klebsiella oxytoca*, известная как условно-патогенный микроорганизм, не является типичным представителем нормальной микрофлоры ротовой полости человека и описана как возбудитель оппортунистических инфекций [15]. Выявленные псевдомонады показали устойчивость к нитрофуранам (нитрофурантоин) и цефалоспорином (цефазолин), пенициллинам (ампициллин и амоксициллин/клавуло-



Рис. 3. Филогенетические деревья *Micrococcus* spp. strain VT1708 и *Pseudomonas* spp. strain VT1612.

а — *Micrococcus* sp. strain VT1708; б — *Pseudomonas* sp. strain VT1612.

нат), фосфомицину, триметоприм/сульфаметоксазолу, хлорамфениколу и клиндамицину.

Из ротовой полости были также выделены микробы, которые по морфологии похожи на известные бактерии, но по биохимической активности не могли быть достоверно отнесены к представителям идентифицированных родов и видов (сходство не превышало 85%). Бактерии, имеющие сходство с *Micrococcus luteus*, отличались от известного вида характером роста, размером и формой клеток, пигментом и другими признаками. Часть бактерий по биохимической активности не могла быть идентифицирована автоматической системой Vitec-2 с последней версией базы данных и отнесена к категории «Unidentified organism».

Отсутствие полного сходства биологических свойств бактерий, идентифицированных автоматической системой Vitec-2 как *Micrococcus luteus*, а также присутствие в ротовой полости некоторых бактерий, и прежде всего *Pseudomonas oryzihabitans*, вызывало сомнение в точности их идентификации. В связи с этим был проведен анализ последовательности нуклеотидов гена, кодирующего 16S рибосомальной ДНК этих бактерий. Полученные сиквенсы ДНК бактерий были сравнены с данными, суммированными в базах (BLAST и HOND). Установлено, что бактерии, первоначально идентифицированные как *Micrococcus luteus*, по составу нуклеотидов гена 16S рибосомальной РНК больше похожи на бактерии вида *Rothia mucilaginosa* (рис. 3, а). Бактерии, отнесенные по биохимическим свойствам к виду *Pseudomonas oryzihabitans*, после генетического анализа показали сходство с различными

видами рода *Pseudomonas*, причем *Pseudomonas oryzihabitans* среди них отсутствует (рис. 3, б).

Таким образом, генетический анализ свидетельствует, что некоторые выделенные бактерии (*Micrococcus luteus* и *Pseudomonas oryzihabitans*) скорее всего представляют собой новые, ранее не известные виды микроорганизмов.

Полученные данные указывают на очень важный факт отсутствия в нормальной микрофлоре пока неизвестных и неизученных условно-патогенных микроорганизмов, выделение и правильная идентификация которых в лабораторных условиях пока невозможна.

Носительство условно-патогенных бактерий в ротовой полости считается важным фактором в появлении различных соматических заболеваний [1]. Практически все выделенные и идентифицированные бактерии способны вызывать гнойно-воспалительные процессы и являются потенциальными возбудителями различных поражений ЛОР-органов. С наличием таких бактерий, не дающих рост в стандартных лабораторных тестах, может быть связана часть случаев неэффективной лабораторной диагностики заболеваний. Обращает на себя внимание устойчивость выделенных штаммов к различным антибиотикам, что повышает потенциальную опасность этих микроорганизмов.

Таким образом, в ходе исследования выделены смешанные микробные биопленки, из которых изолированы бактерии, не известные ранее как представители микробиоты ротовой полости и способные вызывать заболевания, актуальные для оториноларингологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тец В.В. Роль микрофлоры полости рта в развитии заболеваний человека: обзор. *Стоматология* 2008; 87: 3: 76—80.
2. Тец В.В. Инфекции в оториноларингологии. Клиническая микробиология. Микроорганизмы и антибиотики. СПб: Клет-Т 2009.
3. Georgalas C., Kanagalingam J., Zainal A., Ahmed H., Singh A., Patel K.S. The association between periodontal disease and
4. Rajasuo A., Jousimies-Somer H., Savolainen S., Leppänen J., Murtomaa H., Meurman J.H. Bacteriologic Findings in Tonsillitis and Pericoronitis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 1: 51—60.
5. Lewis K., Epstein S.S. Persisters, biofilms, and the problem of culturability in incultivated microorganisms. In Series: peritonsillar infection: A prospective study. *Otolaryng Head Neck* 2002; 126: 1: 91—94.

- Microbiology Monographs. Steinbuchel A. (ed.). Berlin. Heidelberg: Springer 2009; 181—194.
6. Epstein S.S. General model of microbial uncultivability in uncultivated microorganisms. In Series: Microbiology Monographs. Steinbuchel A. (ed.). Berlin. Heidelberg: Springer 2009; 131—150.
 7. Тец В.В., Вечерковская М.Ф., Доморад А.А., Викина Д.С., Михайлова Д.В., Онищенко Е.И., Тец Г.В., Трофимова Ю.А., Харламова В.В. Микробы, неизвестные как представители нормальной микрофлоры ротовой полости человека. Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова 2012; 3: 5—9.
 8. Тец Г.В., Викина Д.С., Вечерковская М.Ф., Доморад А.А., Харламова В.В., Тец В.В. Новые подходы к изучению условно-патогенных бактерий микрофлоры ротовой полости человека. Стоматология 2013; 1: 14—16.
 9. Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. Current Protocols in Molecular Biology. Copyright © 2003 by John Wiley and Sons, Inc.
 10. Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Förster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lüssmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., Schleifer K.H. ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Res 2004; 32: 4: 1363—1371.
 11. Tetz V.V. Colony-like communities of bacteria. Microbios 1994; 80: 63—65.
 12. Tetz V.V. Formation and structure of mixed bacterial communities. APMIS 1999; 107: 645—654.
 13. Kerbaugh M.A., Evans J.B. *Aerococcus viridans* in the Hospital Environment. Appl Microbiol 1968; 16: 519—523.
 14. Ohara-Nemoto Y., Haraga H., Kimura S., Nemoto T.K. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. J Med Microbiol 2008; 57: 95—99.
 15. Ménard A., Harambat J., Pereyre H.S., Pontailier J.R., Mégraud F., Richer O. First report of septic arthritis caused by *Klebsiella oxytoca*. J Clin Microbiol 2010; 48: 8: 3021—3023.
 16. Palazzo I.C.V., d'Azevedo P.A., Secchi C., Pignatari A.C., Darini A.L. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 1222—1226.
 17. Conti S., dos Santos S.S.F., Koga-Ito C.Y. Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae on the dorsum of the human tongue. Appl Oral Sci 2009; 17: 5: 375—380.
 18. Kodama K., Kimura N., Komagata K. Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens. IJSEM 1985; 35: 4: 467—474.