

Unknown bacteria in oral flora of children with hematological malignancies

M.F. Vecherkovskaya, G.V. Tetz, and V.V. Tetz

ABSTRACT

The aim of this study was to explore oral microbiota of children with oncohematological diseases. Differences in composition of microflora between healthy children and children with hematological malignancies are described. During our research out of bacterial biofilms derived from saliva of children with oncohematological diseases we have isolated species that had not been isolated from saliva of healthy children in the same study.

Microbiological characteristics among data derived from genome sequence and proteome analysis indicate that this isolate may belong to new, previously undescribed species.

Keywords: uncultured bacteria, biofilms, microbiota, children.

Accepted: April 13, 2014

I.P. Pavlov Saint Petersburg State Medical University
197022, ul. L'va Tolstogo, d. 6/8, St. Peterburg, Russian Federation

M.F. Vecherkovskaya, Assistant of department of microbiology, virology, and immunology

G.V. Tetz, PhD, Senior scientific worker, Laboratory of microbiology, virology, and immunology

V.V. Tetz, DSci, Professor, Head of department of microbiology, virology, and immunology

Address correspondence to:

M.F. Vecherkovskaya
197022, ul. L'va Tolstogo, d. 6/8, St. Peterburg, Russian Federation
Tel.: +7 (812) 4997050, e-mail: mashavecher@yahoo.com

Неизвестные бактерии в микрофлоре ротовой полости у детей с онкогематологическими заболеваниями

М.Ф. Вечерковская, Г.В. Тец, В.В. Тец

РЕФЕРАТ

Целью настоящей работы было изучить микробиоту ротовой полости у детей с онкогематологическими заболеваниями. У этой категории пациентов из смешанных биопленок изолирован микроорганизм, не встречающийся у здоровых детей того же возраста. Данные микробиологического изучения, оценка протеома и характеристик генома, включая его полный сиквенс, показали принадлежность выделенного микроба к ранее неизвестному виду стрептококков.

Ключевые слова:

«пока некультивируемые бактерии», биопленки, микробиота, дети.

Принято в печать: 13 апреля 2014 г.

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии, представленные в составе микрофлоры различных биотопов человека, играют важную роль в формировании и поддержании различных функций организма [1]. Несмотря на очевидную значимость для медицины, бактерии, составляющие нормальную микрофлору организма человека, остаются недостаточно изученными. Считается, что идентифицировано 20–30 % микроорганизмов нормальной микрофлоры. Отсутствие методов культивирования большинства бактерий служит основным препятствием в изучении микробиоты. Согласно общепринятому мнению, это связано с организацией жизни бактерий в составе устойчивых сообществ — биопленок, в которых проявляется взаимозависимость микроорганизмов и создаются ситуации, пока невозпроизводимые в лабораторных условиях [2–5]. Изучение генов микробиоты показало, что в число неизученных и практически неизвестных входят различные бактерии, археи (одноклеточные микроорганизмы, не имеющие ядра, а также

каких-либо мембранных органелл) и грибы, получившие обозначение «пока некультивируемые».

Показано, что микрофлора детей отличается от микрофлоры взрослых [6]. Несмотря на большой интерес к микробиоте детей, исследования в этой области проводятся лишь при самых широко распространенных патологических состояниях [7–10]. Хорошо известно, что на фоне химиотерапии происходят изменения микрофлоры ротовой полости, которые приводят как к местным, так и системным осложнениям [11]. В литературе встречается достаточно много работ, посвященных профилактике этих осложнений, основанных на микробиологических данных [12]. Однако исследования микробиоты у детей на фоне лечения практически отсутствуют.

Целью настоящей работы было изучить состав нормальной микрофлоры ротовой полости у детей с онкогематологическими заболеваниями, выделить и идентифицировать малоизученные или неизвестные ранее аэробные условно-патогенные бактерии, которые могут вызывать поражения различной локализации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал

Слюна детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии в возрасте 2–10 лет и здоровых детей. Каждая группа состояла из 10 детей. Нестимулированную слюну собирали в стерильные пластиковые контейнеры с широким горлышком, объемом 15 мл, содержащие 1 мл тиогликолевой среды (НИЦФ РФ), в течение 1–2 мин. Материал доставляли в лабораторию в течение 1 ч.

Культивирование

Для выделения бактерий использовали жидкие и агаризованные питательные среды: бруцелла агар, эндо, кровяной колумбия агар, агаризованная среда LB (bioMerie). Колонии анализировали по характеру роста, морфологии и изменениям свойств среды. Для оценки чувствительности к антибиотикам использовали диско-диффузионный метод. Среди испытанных антибиотиков были амоксициллин, ципрофлоксацин, цефотаксим, кларитромицин, азитромицин, рокситромицин, амикацин, меропенем, левомицетин, клиндамицин, триметоприм/сульфаметоксазол.

Для световой микроскопии бактерии окрашивали по Граму. Использовали микроскоп Olympus BX51TF (Olympus, Япония), микрофотографии получали с помощью цифровой камеры ProgRes CF (Jenoptic, Германия), соединенной с микроскопом адаптером U-TV.63XC (Olympus, Япония). При работе с камерой использовали программу ProgRes® MAC CapturePro version 2.7.6 (Jenoptic, Германия).

Ультраструктуру бактерий изучали с помощью электронного микроскопа JEM-100S (Jeol, Япония).

Чистые культуры идентифицировали по биохимической активности с помощью автоматической системы Vitek-2 (BioMerieux). Идентификацию бактерий по протеому (совокупности экспрессируемых в клетке белков) проводили с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF с пробоподготовкой на микротитрационных планшетах AnchorChip (Bruker Corporation, США). Идентификация осуществлялась с применением MALDI Biotyper Database (Bruker Taxonomy Tree) (Bruker Corporation, США).

Метод выделения ДНК и сиквенс гена 16S рибосомальной РНК

Выделение ДНК проводили фенол-хлороформным методом [13]. Нуклеотидную последовательность генов определяли с использованием набора для термоциклического секвенирования BigDye™ Terminator v.3.1, Cycle Sequencing (Applied Biosystem, США) согласно рекомендациям производителя. Продукты реакции анализировали с использованием автоматического секвенатора ABI Prism Genetic Analyzer 3730XL (Applied Biosystem, США; Hitachi, Япония). Конверсию исходных хроматографических данных в формат *.txt и *.ab1 осуществляли с использованием программного пакета Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems, США). Анализ данных выполняли с применением программного пакета Sequence Scanner (Applied Biosystems, США). Проверку на образование химер проводили с помощью программы DECIPHER [14].

Дендрограммы для филогенетического анализа строили с использованием программы ARB v 5.5 [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из исследуемого материала были получены смешанные биопленки (колонии, состоящие из нескольких видов микроорганизмов), похожие по морфологии на обычные колонии, образованные бактериями одного вида. Каждая из них включала 2–8 различных бактерий. Чистые бактериальные культуры в использованных условиях в первом высеве практически не были обнаружены.

По организации выявленные биопленки были идентичны смешанным микробным сообществам, полученным нами ранее экспериментально [16, 17].

В результате расщепов на разные среды часть смешанных биопленок удалось разделить и получить из них чистые культуры бактерий, пригодных для идентификации. В то же время большинство смешанных биопленок разделить в использованных условиях не удалось. Они оказались устойчивыми сообществами, которые выдерживали многократные (изучено более 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 указывают на выраженный мутуализм (взаимовыгодный симбиоз) 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.

У здоровых детей и детей с онкогематологическими заболеваниями из смешанных биопленок микробиоты в виде чистых культур выделены и идентифицированы по биохимическим тестам (достоверность 98–99 %) различные бактерии, принадлежащие к известным родам и видам. Среди грамположительных бактерий обнаружены *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus anginosus*, *Sstreptococcus pluranimalium*, *Corynebacterium spp.* Из слюны были также изолированы чистые культуры грамотрицательных аэробных бактерий. Так, были идентифицированы *Neisseria sicca* и *Neisseria subflava*.

У 6 детей с онкогематологическими заболеваниями был изолирован микроорганизм, не встречавшийся в наших исследованиях у здоровых детей того же возраста.

Первоначально данные бактерии входили в состав смешанных биопленок, включавших 3 бактерии, которые можно было по морфологическим признакам разделить на морфотипы по данным световой микроскопии (рис. 1). В результате дальнейших исследований удалось выделить из этой ассоциации один — грамположительные кокки, получивший название VT162. По данным электронной микроскопии эти бактерии имеют типичные морфологические свойства грамположительных бактерий, в первую очередь организацию клеточной стенки (рис. 2). Согласно результатам биохимической активности данные бактерии были идентифицированы как *Granulicatella adiacens*, при этом анализатор указывал на низкую достоверность дискриминации. Изучение протеома этих бактерий показало, что они являются *Streptococcus oralis*.

Отсутствие полного сходства биологических свойств бактерий, выявленных автоматической системой Vitek-2

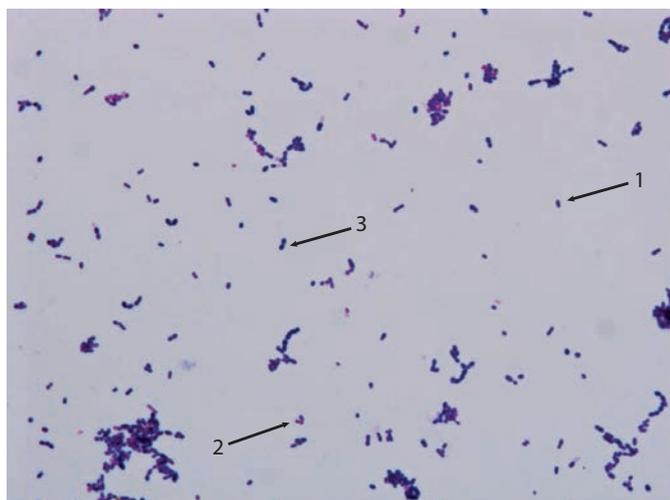


Рис. 1. Микрофотография бактерий. Окраска по Граму, $\times 1000$:
1 — грамположительные кокки; 2 — грамотрицательные кокки;
3 — грамположительные кокки (2-й тип)

и данными анализа их протеома, вызывало сомнение в точности их идентификации. В связи с этим был проведен анализ последовательности нуклеотидов гена, кодирующего 16S рибосомальную РНК этих бактерий. Полученные сиквенсы ДНК бактерий были сопоставлены с данными, суммированными в базах NCBI (ref_seq genomic, WGS) и HOMD (Ref_seq v13.2).

Установлено, что бактерии, первоначально идентифицированные как *Granulicatella adiacens*/*Streptococcus oralis*, по составу нуклеотидов гена 16S рибосомальной РНК больше похожи на бактерии *Streptococcus* sp. Hot_487, еще не полученные как чистая микробная культура и для которых пока только обнаружен ген 16S рибосомальной РНК (рис. 3).

Таким образом, генетический анализ свидетельствует о том, что выделенные бактерии, скорее всего, представляют собой новый, ранее неизвестный вид микроорганизмов. Изолированные бактерии вырабатывают гемолизины, что позволяет предположить их потенциал в качестве патогенного или условно-патогенного микроорганизма. Полученный штамм чувствителен ко многим препаратам основных групп антибиотиков. Эти данные указывают на отсутствие направленной селекции при терапии, как это бывает, когда микроорганизм идентифицирован как причина патологического состояния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывают на присутствие в микрофлоре детей с онкогематологическими заболеваниями неизвестных и неизученных микроорганизмов, выделение и правильная идентификация которых существующими рутинными микробиологическими методами в лабораторных условиях пока невозможны.

Носительство условно-патогенных бактерий в ротовой полости считается важным фактором в появлении различных соматических заболеваний [18]. С наличием таких бактерий, не дающих рост в стандартных лабораторных условиях, может быть связана часть случаев неэффективной лабораторной диагностики и лечения инфекций различной локализации.

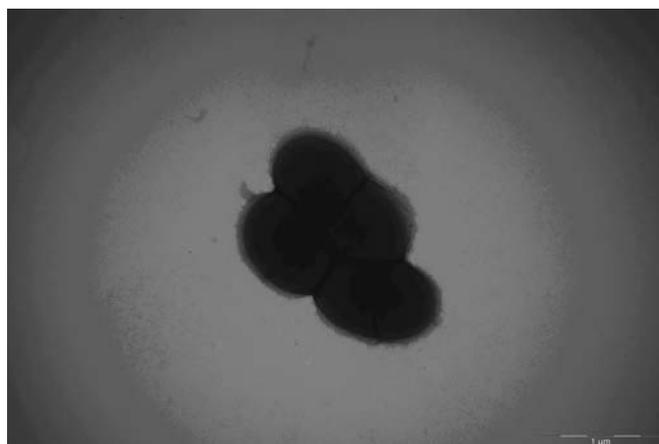


Рис. 2. Электронная микроскопия. Негативное контрастирование

Таким образом, в ходе исследования у детей с онкогематологическими заболеваниями выделены смешанные микробные биопленки, из которых изолированы условно-патогенные бактерии, неизвестные ранее как представители микробиоты ротовой полости.

Сиквенс гена 16S рНК *Streptococcus* sp. VT 162, доступен в NCBI, под номером KF780584.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sommer F., Backhed F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. Nat. Publ. Group 2013; 11: 227–38.
2. Lewis K., Epstein S.S. Persisters, biofilms, and the problem of culturability in uncultivated microorganisms. In Series: Microbiology Monographs. Ed. by A. Steinbuchel. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009: 181–94.
3. Epstein S.S. General model of microbial uncultivability in uncultivated microorganisms. In Series: Microbiology Monographs. Ed. by A. Steinbuchel. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009: 131–50.
4. Тец В.В., Вечерковская М.Ф., Доморад А.А. и др. Микробы, неизвестные как представители нормальной микрофлоры ротовой полости человека. Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова 2012; 3: 5–9.
5. [Tets V.V., Vecherkovskaya M.F., Domorad A.A., et al. Microbes unknown as members of normal human oral microflora. Uchenyye zapiski SPbGMU im. I.P. Pavlova 2012; 3: 5–9. (In Russ.)].
6. Тец Г.В., Викина Д.С., Вечерковская М.Ф., Доморад А.А. и др. Новые подходы к изучению условно патогенных бактерий микрофлоры ротовой полости человека. Стоматология 2013; 1: 14–6.
7. [Tets G.V., Vikina D.S., Vecherkovskaya M.F., Domorad A.A., et al. New approaches to studying opportunistic bacteria of human oral microflora. Stomatologiya 2013; 1: 14–6. (In Russ.)].
8. Crielaard W., Zaura E., Schuller A.A. et al. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. BMC Med. Genom. 2011; 4: 22.
9. Johansson M.A., Sjogren Y.M., Persson J.O. et al. Early Colonization with a Group of Lactobacilli Decreases the Risk for Allergy at Five Years of Age Despite Allergic Heredity. PLoS One 2011; 29(35): 5860–8.
10. Candela M., Rampelli S., Turroni S. et al. Unbalance of intestinal microbiota in atopic children. BMC Microbiol. 2012; 12: 95.
11. Tanner A.C., Kent R.L. Jr., Holgerson P.L. et al. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. J. Dent. Res. 2011; 90: 1298–305.
12. Payne A.N., Chassard C., Zimmermann M. et al. The metabolic activity of gut microbiota in obese children is increased compared with normal-weight children and exhibits more exhaustive substrate utilization. Nutr. Diab. 2011; 1(7): e12.
13. Javed F., Utrija A., Bello Correa F.O. et al. Oral health status in children with acute lymphoblastic leukemia. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2012; 83: 303–9.
14. Lanzas I., Herrera D., Santos S. et al. Microbiological effects of an antiseptic mouth-rinse in irradiated cancer patients. Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal. 2011; 16(7): e1036–42.

15. Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. Curr. Prot. Mol. Biol. John Wiley and Sons, Inc., 2003.

16. Wright E.S., Yilmaz L.S., Noguera D.R. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. Appl. Environ. Microbiol. 2012; 78: 717–25.

17. Ludwig W., Strunk O., Westram R. et al. ARB: a software environment for sequence data. Nucl. Acids Res. 2004; 32: 1363–71.

18. Tetz V.V. Colony-like communities of bacteria. Microbios. 1994; 80: 63–5.

19. Tetz V.V. Formation and structure of mixed bacterial communities. APMIS 1999; 107: 645–54.

20. Тец В.В. Роль микрофлоры полости рта в развитии заболеваний человека. Стоматология 2008; 3: 76–80.

[Tetz G.V. Role of oral microflora in development of human diseases. Stomatologiya 2008; 3: 76–80. (In Russ.)].

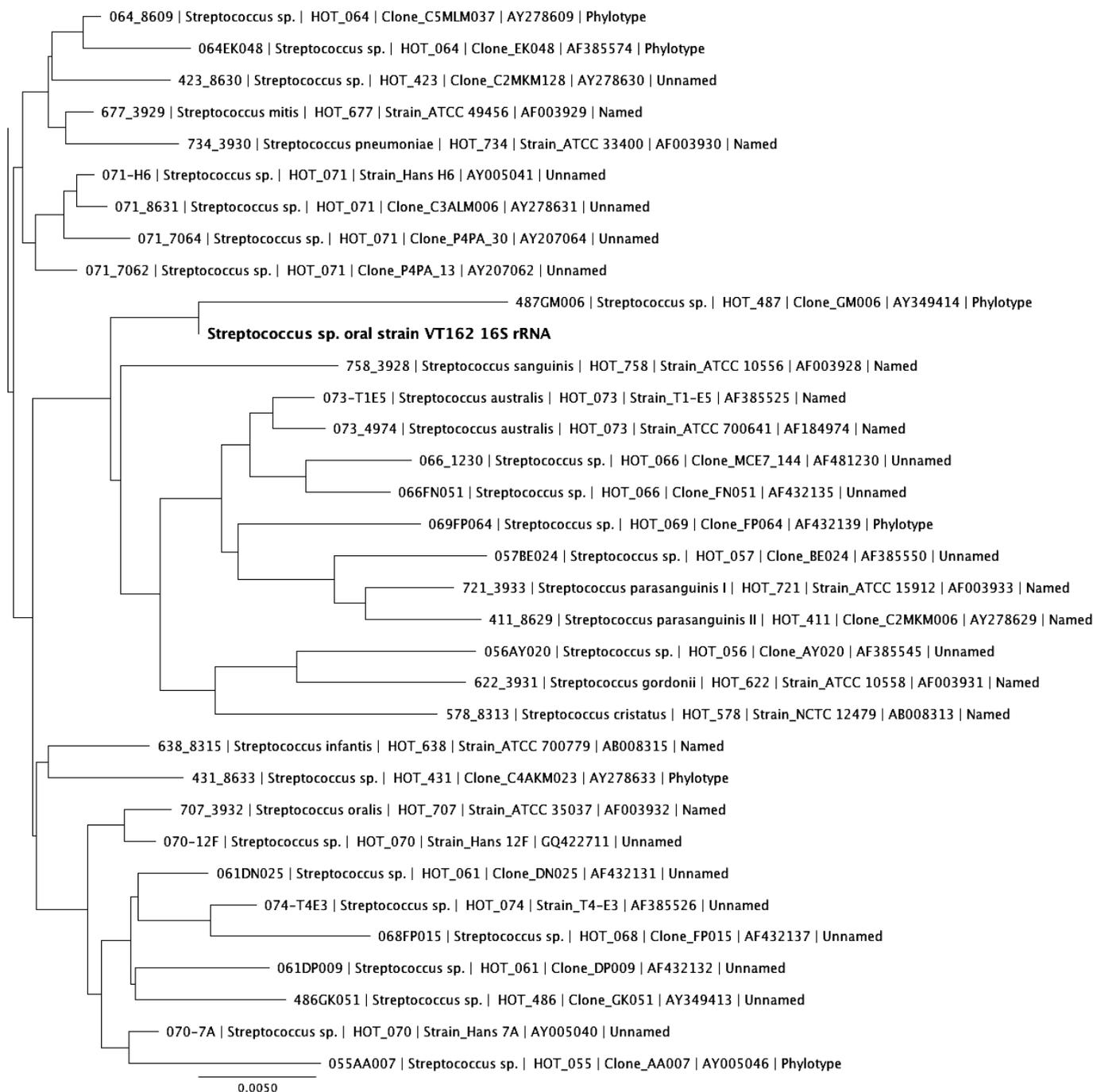


Рис. 3. Дендрограмма VT162 по данным гена 16S рибосомальной РНК

М.Ф. Вечерковская — ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии

Г.В. Тец — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии, вирусологии и иммунологии

В.В. Тец — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии

Адрес для переписки: М.Ф. Вечерковская, 197022 ул. Льва Толстого 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, тел.: +7 (812) 4997050, e-mail: mashavecher@yahoo.com