

ПОЛОСТЬ РТА КАК ЛОКУС ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕТЕРОГЕННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

О.В. Кондратенко, М.С. Сабурова

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме. Муковисцидоз является важной медико-социальной проблемой. Несмотря на значительные успехи современной науки и практики, бактериальные осложнения по-прежнему остаются одной из основных причин летальности пациентов. Одним из значимых возбудителей бактериальной инфекции при муковисцидозе является *Pseudomonas aeruginosa*, способная приводить к быстрому снижению легочной функции. В то же время нижние дыхательные пути — это не единственный локус для микробной колонизации. Показана роль параназальных синусов как очага для первичного попадания и последующей адаптации клинически значимых при муковисцидозе патогенов. Полость рта также может служить резервуаром для первичного попадания и адаптации штаммов. Однако этому посвящены лишь единичные исследования. В сообщении приводится описание клинического случая выделения гетерогенной микробной популяции *P. aeruginosa* из различных локусов полости рта и мокроты пациента с муковисцидозом. При этом выделенные из полости рта и мокроты штаммы различались по своим культуральным свойствам и антибиотикорезистентности. Выполнен протеомный анализ масс-спектров 11 изолятов и их сопоставление между собой и контрольным штаммом *P. aeruginosa* ATCC 27853 с визуализацией с помощью ССИ-матрицы. В результате проведенного анализа выявлен высокий уровень гетерогенности исследуемой популяции, при этом лишь для отдельных пар изолятов получены высокие значения ССИ Score. Показано, что штаммы, выделенные из мокроты пациента, оказались более однородными по белковым профилям, чем культуры, выявленные с различных участков слизистой оболочки полости рта. При этом в случае выделения нескольких морфотипов *P. aeruginosa* из одного локуса в полости рта близкородственных штаммов выделено не было. Показано, что полость рта является более значимой с точки зрения микробной диссоциации при муковисцидозе, что может быть обусловлено более разнообразными микроэкологическими условиями. Представители микробиологического сообщества посредством микроаспирации могут реколонизировать трахеобронхиальное дерево, тем самым способствуя поддержанию инфекционного воспаления в нижних дыхательных путях и частично объясняя неэффективность небулайзерной антибактериальной терапии. В то же время и клоны, адаптировавшиеся в легочной ткани при откашливании мокроты способны реколонизировать локусы полости рта. Полученные данные актуализируют вопрос о необходимости комплексного микробиологического подхода при проведении обследования пациентов для повышения эффективности эрадикационных мероприятий при муковисцидозе.

Ключевые слова: муковисцидоз, полость рта, мокрота, синегнойная инфекция, масс-спектрометрия, гетерогенность.

Адрес для переписки:

Кондратенко Ольга Владимировна
443079, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 18,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (846) 374-10-04, доб. 4574.
E-mail: o.v.kondratenko@samsmu.ru

Contacts:

Olga V. Kondratenko
443079, Russian Federation, Samara, Gagarin str., 18,
Samara State Medical University.
Phone: +7 (846) 374-10-04, add. 4574.
E-mail: o.v.kondratenko@samsmu.ru

Для цитирования:

Кондратенко О.В., Сабурова М.С. Полость рта как локус для формирования гетерогенной бактериальной популяции у пациентов с муковисцидозом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1181–1185. doi: 10.15789/2220-7619-TOC-1992

Citation:

Kondratenko O.V., Saburova M.S. The oral cavity as a site for developing a heterogeneous bacterial population in patients with cystic fibrosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1181–1185. doi: 10.15789/2220-7619-TOC-1992

THE ORAL CAVITY AS A SITE FOR DEVELOPING A HETEROGENEOUS BACTERIAL POPULATION IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

Kondratenko O.V., Saburova M.S.

Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russian Federation

Abstract. Cystic fibrosis is an important medical and social problem. Despite significant advances in modern science and practice, bacterial complications are still among the main causes of patient mortality. One of the crucial bacterial pathogens in cystic fibrosis is *Pseudomonas aeruginosa*, which can lead to rapidly decreased pulmonary function. At the same time, the lungs are not the only site for microbial colonization. The oral cavity can also serve as a reservoir for initial entry and adaptation of microbial strains, which, however, were only sparsely investigated. A clinical case of isolated heterogeneous microbial population of *P. aeruginosa* from various loci of the oral cavity and sputum of a patient with cystic fibrosis is described. A proteomic mass-spectrum analysis obtained from eleven isolates as well as their mutual comparison with the control strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853 visualized with CCI matrix was performed. As a result, a high level of heterogeneity of the studied population was revealed, while high CCI Score values were obtained only for individual pairs of isolates. It was shown that the bacterial strains isolated from the patient sputum turned out to be more homogeneous in protein profiles than cultures detected from various oral sites. At the same time, in case of isolated several morphotypes of *P. aeruginosa* from single oral site, no closely related strains were found. Thus, it is shown that the oral cavity is more important viewed from microbial dissociation in cystic fibrosis, which may be due to more diverse microecological conditions. Representatives of the microbiological community can recolonize the tracheobronchial tree through microaspiration, thereby contributing to the maintenance of infectious inflammation in the lower respiratory tract and partially accounting for ineffectiveness of nebulized antibacterial therapy. At the same time, clones adapted to the lung tissue upon coughing up sputum are able to colonize oral sites. The data obtained actualize the question of the need for a comprehensive microbiological approach while examining patients to increase effectiveness of eradication measures in cystic fibrosis.

Key words: cystic fibrosis, oral cavity, sputum, *Pseudomonas aeruginosa* infection, mass-spectrometry, heterogeneity.

Введение

Муковисцидоз — самое распространенное аутосомно-рецессивное генетически детерминированное заболевание. В последние десятилетия продолжительность и качество жизни больных значительно возросли, что позволило ему выйти далеко за рамки педиатрической патологии. В связи с оптимизацией проводимой терапии и ранней диагностики в России и мире отмечается увеличение доли подростков и взрослых пациентов с муковисцидозом, что, в свою очередь, раскрывает перед врачами новые аспекты осложнений этого заболевания. По-прежнему одной из основных причин ранней летальности являются бактериальные осложнения бронхолегочной системы [1]. На сегодняшний день хорошо известен вклад основных бактериальных патогенов, имеющих ключевое значение при муковисцидозе, в частности инфекции, ассоциированной с *Pseudomonas aeruginosa* [2]. Но легкие это не единственный биотоп для колонизации. Многочисленными исследованиями показана роль параназальных синусов как локуса для первичного попадания и последующей адаптации штаммов [43]. В то же время, описанию потенциальной роли полости рта в качестве резервуара для бактериальной микрофлоры посвящены лишь единичные публикации [3]. Необходимость и значимость регулярного стоматологического и микробиологического обследования полости рта не регламентирована действующими рекомендациями. Исходя из этого, вероятная

роль полости рта как локуса для адаптации и последующей диверсификации клинически значимых патогенов не учитывается при оказании медицинской помощи пациентам с муковисцидозом. Это может быть одним из ключевых факторов, объясняющих неэффективность стандартных схем антисинегнойной эрадикационной терапии. В качестве иллюстрации этого феномена нами приводится описание результатов клинико-микробиологического обследования пациента с муковисцидозом, имеющего интермиттирующие высевы синегнойной инфекции из легких в анамнезе на протяжении жизни.

Материалы и методы

Пациент А., 2007 г. рожд., мужчина. При проведении планового стоматологического обследования не выявлено патологии, полость рта санирована. Во время осмотра у пациента был произведен забор проб биоматериала из восьми локусов полости рта. Стерильными пластиковыми зондами с ватным тампоном вращательным движением собирался материал с поверхности слизистой оболочки щеки и с поверхности спинки языка; с щечной поверхности первых моляров верхней челюсти и язычной поверхности центральных резцов нижней челюсти стоматологическим скалером было произведено снятие минерализованных и неминерализованных зубных отложений; выделенный из выводных протоков правых и левых околоушных и подъязычных слюнных желез секрет

собирались стерильными пластиковыми зондами; эндодонтическим бумажным штифтом размера 15.02 производился сбор десневой жидкости. Все собранные пробы биоматериала были помещены в предварительно промаркированные пробирки с жидкой тиогликолевой средой и доставлены в изотермических условиях в лабораторию в течение 20 мин после сбора.

В лаборатории посев каждой пробы осуществлялся на следующие питательные среды: на поверхность двух чашек с 5% кровяным агаром с дефибрированной бараньей кровью (HiMedia, Индия), двух чашек с универсальной хромогенной средой (BioRad, США), чашек с селективной средой для *Burkholderia cepacia* (OFPBL-агар) с бацитрацином и полимиксина сульфатом (HiMedia, Индия), Veilonella-агаром (HiMedia, Индия), агаром для анаэробов (HiMedia, Индия), Clostridium-агаром (HiMedia, Индия), агаром для лактобактерий (HiMedia, Индия), агаром для бифидобактерий (HiMedia, Индия) с использованием техники посева «штрихом». На поверхность чашек с агаром Сабуро с хлорамфениколом производился посев гомогенизированного материала методом бляшек с последующей инкубацией при 28°C до 14 сут с ежедневными просмотрами посевов. Затем по одной засеянной чашке с 5% кровяным агаром с дефибрированной бараньей кровью и с универсальной хромогенной средой, а также чашка с селективной средой для *Burkholderia cepacia* (OFPBL-агар) с бацитрацином и полимиксина сульфатом инкубировались в термостате при температуре 37°C в течение 24–48 ч с ежедневным просмотром посевов. При этом засеянные чашки с селективной средой для *Burkholderia cepacia* (OFPBL-агар) с бацитрацином и полимиксина сульфатом инкубировались в аэробных условиях 24–48 ч при температуре 37°C, далее инкубировались до 14 сут при температуре 28°C с ежедневным просмотром посевов. По одной засеянной чашке с 5% кровяным агаром с дефибрированной бараньей кровью и с универсальной хромогенной средой, а также чашки с Veilonella-агаром, агаром для анаэробов, Clostridium-агаром, агаром для лактобактерий, агаром для бифидобактерий инкубировались в анаэробных условиях 96–120 ч при температуре 37°C.

Идентификация выделенных штаммов производилась с помощью MALDI-ToF масс-спектрометра (Bruker, Германия). Со штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из локусов полости рта, а также параллельно из мокроты пациента были сняты белковые спектры методом экстракции муравьиной кислотой. Последующая визуализация протеомного сопоставления полученных масс-спектров проводилась с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker, Германия).

В отношении исследуемых штаммов был проведен расчет составного индекса корреляции (Composite Correlation Index — CCI).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного микробиологического исследования у пациента из полости рта было выделено 34 штамма микроорганизмов, среди которых были представители пародонтопатогенных бактерий, в частности *Actinomyces odontolyticus* («пурпурный» пародонтопатогенный комплекс), *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* («желтый» пародонтопатогенный комплекс), что оценивается как фактор риска по развитию заболеваний пародонта в дальнейшем.

Кроме этого, был получен рост девяти штаммов *P. aeruginosa* в посевах из пяти локусов — с поверхности десневой борозды (штамм № 2), устья протоков правых подъязычной (штаммы № 7 и № 8) и околоушной слюнных желез (штамм № 6), поверхности языка (штаммы № 11 и № 12) и слизистой оболочки щек (штаммы № 9 и № 10). В мокроте пациента был получен рост гетерогенной популяции *P. aeruginosa*, включающей в себя мукоидный штамм (штамм № 4), чувствительный ко всем тестируемым препаратам; немучкоидный штамм (штамм № 3), с изолированной устойчивостью к имипенему; а также штамм с морфотипом мелких колоний (штамм № 5), чувствительный ко всем тестируемым препаратам. Штамм, выделенный с поверхности десневой борозды, был мукоидным и сохранял чувствительность ко всем антибиотикам. С устья протока подъязычной слюнной железы выделена гетерогенная популяция возбудителя в виде смеси чувствительного мукоидного беспигментного морфотипа и немучкоидного пигментированного клона. Со слизистой оболочки языка также выделена смесь колониальных морфотипов чувствительного беспигментного мукоидного и немучкоидного, с изолированной устойчивостью к ципрофлоксацину. Со слизистой оболочки щеки также получена морфологически однородная смесь двух мукоидных морфотипов с гетерорезистентностью к имипенему.

Учитывая широкий спектр выделенных клонов, демонстрирующих как морфологические различия, так и отличающихся по антибиотикорезистентности, нами было проведен анализ однородности культур на основании белковых профилей (масс-спектров). Было выполнено сопоставление имеющихся масс-спектров с применением статистических расчетов с последующей визуализацией в виде CCI-матрицы (рис., вклейка, с. II). При использовании указанного метода возможно выявление степени совпадения штаммов от полной идентичности

Таблица. Характеристика штаммов *P. aeruginosa*, использованных для построения CCI-матрицыTable. Characteristics of the *P. aeruginosa* strains used to construct the CCI-matrix

Номер штамма Strain number	Описание штамма <i>P. aeruginosa</i> и локуса его выделения Description of the <i>P. aeruginosa</i> strain and relevant site of isolation
1	Контрольный штамм <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Control strain of <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
2	Немукоидный штамм, выделенный с поверхности десневой борозды A non-mucoid strain isolated from the surface of the gingival crest
3	Немукоидный штамм с изолированной устойчивостью к имипенему, выделенный из мокроты A sputum non-mucoid strain with isolated imipenem resistance
4	Мукоидный штамм, выделенный из мокроты Mucoid strain isolated from sputum
5	Немукоидный штамм с морфотипом мелких колоний, выделенный из мокроты A non-mucoid strain with the morphotype of small colonies isolated from sputum
6	Немукоидный штамм, выделенный из устья правой околоушной слюной железы A non-mucoid strain isolated from orifice of the right parotid salivary gland
7	Мукоидный штамм, выделенный из устья правой подъязычной слюной железы Mucoid strain isolated from orifice of the right sublingual salivary gland
8	Немукоидный штамм, выделенный из устья правой подъязычной слюной железы A non-mucoid strain isolated from orifice of the right sublingual salivary gland
9	Немукоидный штамм, выделенный со слизистой оболочки щеки A non-mucoid strain isolated from the cheek mucosa
10	Немукоидный штамм, выделенный со слизистой оболочки щеки с изолированной устойчивостью к имипенему A non-mucoid strain obtained from cheek mucosa with isolated imipenem resistance
11	Немукоидный штамм, выделенный с поверхности языка с изолированной устойчивостью к ципрофлоксацину A non-mucoid strain obtained from the surface of the tongue with isolated ciprofloxacin resistance
12	Мукоидный штамм, выделенный с поверхности языка Mucoid strain isolated from the surface of the tongue

(темно-красный цвет) до отсутствия совпадения (синий цвет). Значение CCI Score может находиться в пределах значений от 0 до 1, при этом 0 определяется как полное отсутствие совпадений, а 1 — полное совпадение или идентичность штаммов. Информация о номерах штаммов, взятых в анализ, представлена в таблице. Пары штаммов с показателями CCI Score более 0,800 расценивались как близкородственные в соответствии с рекомендациями производителя программного обеспечения.

В результате проведенного исследования показано, что в полости рта пациента сформировано гетерогенное бактериальное сообщество, что подтверждается результатами сравнения масс-спектров при построении и анализе CCI-матрицы в виде «тепловой карты».

При анализе масс-спектров культур, выделенных из мокроты, были получены следующие результаты. Штамм № 4 имеет близкое родство с другими штаммами, выделенными из мокроты, однако между штаммами № 3 и № 5 уровень родства оказался ниже 0,800, что позволяет предположить, их формирование и адаптацию в различных микроэкологических условиях.

Штаммы, выделенные из одного локуса слизистой оболочки полости рта, оказались гетерогенными по масс-спектрам. Попарные значения

CCI Score для мукоидного (штамм № 7) и немучоидного (штамм № 8) штаммов, выделенных из устья правой подъязычной слюной железы; для двух немучоидных штаммов (штаммы № 9 и № 10), выделенных со слизистой оболочки щеки, а также мукоидного (штамм № 12) и немучоидного (штамм № 11) штаммов, выделенных с поверхности языка, оказались ниже 0,800.

При сравнении штаммов, выделенных из мокроты со штаммами из полости рта, были выявлены следующие закономерности: штамм № 3 на основании сравнений масс-спектров оказался родственным со штаммами, выделенными из устья правой околоушной слюной железы (штамм № 6) и с языка (штамм № 12). Штамм № 4, выделенный из мокроты близок по масс-спектрам со штаммами, выделенными с поверхности языка (№ 11 и № 12). Штамм № 5, выделенный из мокроты, близок по масс-спектрам к штаммам, выделенным с поверхности десневой борозды (штамм № 2), немучоидными штаммами, выделенными из устья правой подъязычной слюной железы (штамм № 8) и с поверхности языка (штамм № 11).

Наиболее отличающимся по своим масс-спектрам оказался 9 изолят, не имеющий совпадений по масс-спектрам не только от выделенных из мокроты, но и из локусов полости рта штаммов.

Таким образом выявлен высокий уровень гетерогенности исследуемой популяции, при этом только для отдельных пар изолятов выявлен высокий уровень значений CCI Score.

Заключение

Полость рта пациентов с муковисцидозом может быть одним из локусов для первичного попадания, адаптации и последующего формирования гетерогенной популяции бактерий, имеющих доказанное клиническое значение при данной патологии. Представители микробиологического сообщества посредством микроаспирации могут реколонизировать трахеобронхиальное дерево, тем самым способствуя поддержанию инфекционного воспаления в нижних дыхательных путях и частично объясняя неэффективность небулайзерной антибактериальной терапии. В то же время и клоны,

адаптировавшиеся в легочной ткани, при откашливании мокроты способны реколонизировать локусы полости рта.

Было показано, что штаммы, выделенные из мокроты, оказались более однородными, чем культуры, выявленные со слизистой оболочки полости рта. При этом в случае выделения нескольких морфотипов *P. aeruginosa* из одного локуса в полости рта, близкородственных штаммов выделено не было. Таким образом полость рта является более значимой с точки зрения микробной диссоциации, что может быть обусловлено более разнообразными микроэкологическими условиями. Полученные данные актуализируют вопрос о необходимости комплексного микробиологического подхода при проведении обследования пациентов для повышения эффективности эрадикационных мероприятий при муковисцидозе, что следует учитывать клиницистам и микробиологам в своей практической деятельности.

Список литературы/References

1. Красовский С.А., Амелина Е.Л., Каширская Н.Ю., Воронкова А.Ю., Зоненко О.Г. Динамика показателей национального регистра больных муковисцидозом за 2011–2017 года // Сибирское медицинское обозрение. 2019. № 2 (116). С. 14–18. [Krasovsky S.A., Amelina E.L., Kashirskaya N.Yu., Voronkova A.Yu., Zonenko O.G. Dynamics of indicators of the national register of patients with cystic fibrosis for 2011–2017. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2019, no. 2 (116), pp. 14–18. (In Russ.) doi: 10.20333/2500136-2019-2-14-18]
2. Сиянова Е.А., Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Прилипов А.Г., Усачев Е.В., Кондратьева Е.И., Припутневич Т.В., Гордеев А.Б., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., Ильенкова Н.А., Красовский С.А., Шерман В.Д., Воронкова А.Ю., Амелина Е.Л., Усачева М.В. Мониторинг хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa* // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2018. Т. 97, № 2. С. 77–86. [Syanova E.A., Chernukha M.Yu., Avetisyan L.R., Shaginyan I.A., Prilipov A.G., Usachev E.V., Kondratieva E.I., Priputnevich T.V., Gordeev A.B., Kashirskaya N.Yu., Kapranov N.I., Ilyenkova N.A., Krasovsky S.A., Sherman V.D., Voronkova A.Yu., Amelina E.L., Usacheva M.V. Monitoring of chronic lung infection in patients with cystic fibrosis caused by *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. The journal named after G.N. Speransky*, 2018, vol. 97, no. 2, pp. 77–86. (In Russ.)]
3. Coffey N., O'Leary F., Burke F., Roberts A., Hayes M. Periodontal and oral health status of people with cystic fibrosis: a systematic review. *J. Dent.*, 2020, vol. 103: 103509. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103509
4. Hansen S.K., Rau M.H., Johansen H.K., Ciofu O., Jelsbak L., Yang L., Folkesson A., Jarred H.O., Aanaes K., von Buchwald C., Hoiby N., Molin S. Evolution and diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in paranasal sinuses of cystic fibrosis children have implications for chronic lung infection. *ISME J.*, 2012, vol. 6, no. 1, pp. 31–45. doi: 10.1038/ismej.2011.83

Авторы:

Кондратенко О.В., д.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Сабурова М.С., ассистент кафедры терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Kondratenko O.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Saburova M.S., Assistant Professor, Department of Therapeutic Dentistry, Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russian Federation.

Поступила в редакцию 29.06.2022
Принята к печати 18.08.2022

Received 29.06.2022
Accepted 18.08.2022

Иллюстрации к статье «Полость рта как локус для формирования гетерогенной бактериальной популяции у пациентов с муковисцидозом» (авторы: О.В. Кондратенко, М.С. Сабурова) (с. 1181–1185)
 Illustrations for the article “The oral cavity as a site for developing a heterogeneous bacterial population in patients with cystic fibrosis” (authors: Kondratenko O.V., Saburova M.S.) (pp. 1181–1185)

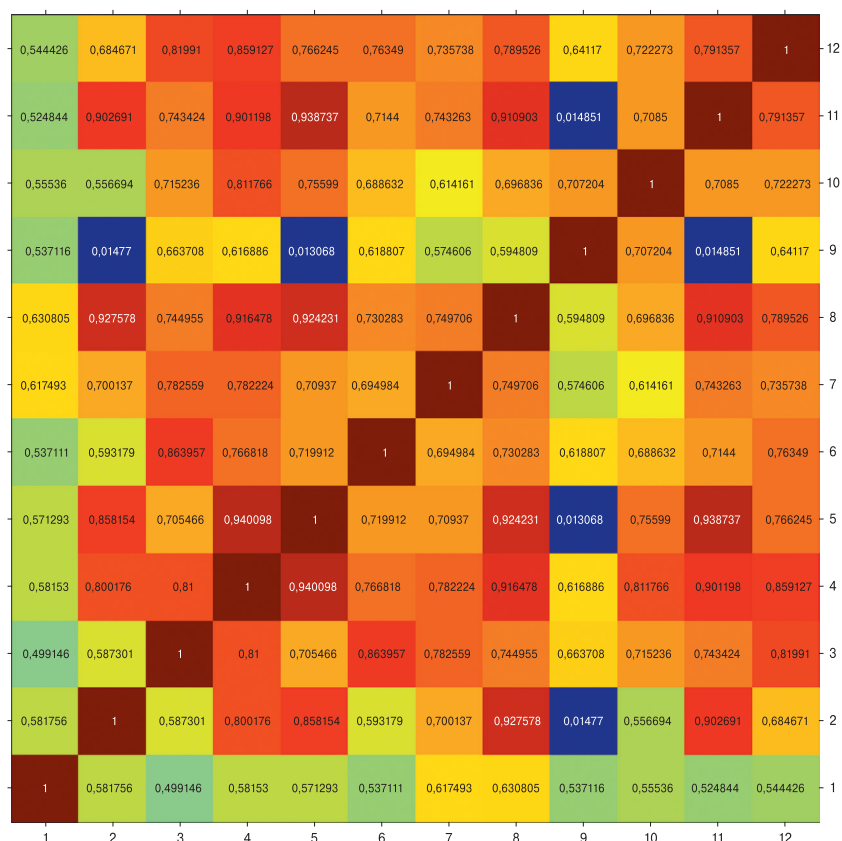


Рисунок. CCI-матрица, построенная с использованием штаммов, выделенных из мокроты и полости рта пациента, и контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853

Figure. CCI-matrix constructed by using strains isolated from the sputum and oral cavity of the patient as well as a control strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853