

Микрофлора ротовой полости детей с онкогематологическими заболеваниями

М. Ф. Вечерковская, Г. В. Тец, Б. В. Афанасьев, В. В. Тец

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

Контакты: Виктор Вениаминович Тец vtetzv@yahoo.com

Целью работы было комплексное изучение микрофлоры ротовой полости здоровых детей и детей с онкогематологическими заболеваниями, основанное на исследовании состава смешанных микробных биопленок, выделении и идентификации новых, ранее неизвестных микроорганизмов.

Материал для исследования получен у детей в возрасте от 2 до 10 лет с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии и в группе сравнения у учеников школ и воспитанников детских садов г. Санкт-Петербурга. В работе использованы микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические методы исследования, включая электронную микроскопию, протеомный анализ, секвенирование и аннотацию полного генома.

Из смешанных микробных биопленок, полученных из слюны здоровых и больных детей, выделили в виде чистых культур и идентифицировали по биохимической активности представителей 23 родов микроорганизмов. В микрофлоре детей с онкогематологическими заболеваниями выявлен неизвестный ранее вид стрептококков с большим числом генов антибиотикоустойчивости и патогенности. Выявлены различия в составе микробиоты ротовой полости здоровых детей и детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии. Микробиота детей с онкогематологическими заболеваниями содержит больше генов, контролирующих антибиотикоустойчивость. Также в ее составе обнаружены ранее неизвестные бактерии рода *Streptococcus*.

Ключевые слова: онкогематологические заболевания, дети, микробиота, ротовая полость, неизвестные ранее бактерии, биопленки

DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-2-51-57

Oral microflora in children with hematologic malignancies

M. F. Vecherkovskaya, G. V. Tets, B. V. Afanasiev, V. V. Tets

Acad. I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 L'va Tolstogo St., St. Petersburg, 197022, Russia

The goal was a comprehensive study of oral microflora in healthy children and those with hematologic malignancies, based on the analysis of mixed microbial biofilms composition, isolation and identification of new previously unknown microorganisms.

The material was obtained in children with hematological diseases in remission, 2–10 years aged, and for the control group from St. Petersburg schoolchildren and in kindergartens. We used microbiological, biochemical and molecular genetic methods, including electron microscopy, proteomic analysis, sequencing and complete genome annotation.

Microorganisms of 23 genera isolated as pure cultures and identified by biochemical activity from mixed microbial biofilm derived from saliva of healthy and sick children. In microflora of children with hematologic malignancies a previously unknown type of streptococci with a large number of antibiotic resistance genes was revealed. Differences in oral microbiota composition of healthy children and children with hematological diseases in remission were revealed. The microbiota of children with hematologic malignancies contains more genes controlling antibiotic resistance. Also, it was observed previously unknown bacterium of the genus *Streptococcus*.

Key words: oncohematological malignancies, children, microbiota, oral cavity, previously unknown bacteria, biofilms

Введение

Современные данные указывают на огромную роль микрофлоры в качестве важнейшего «органа» гомеостаза, влияющего на развитие хозяина, его физиологию и морфогенез [1]. Несмотря на это, микробиота человека остается недостаточно изученной, что в значительной степени связано с существованием микробных биопленок и наличием в их составе неизвестных науке бактерий, обозначаемых как «некультивируемые» и «пока не культивируемые». Условия, необходимые для роста таких бактерий, пока считаются невоспроизводимыми в лабораторных условиях [2]. Одной из наиболее доступных для изучения является микрофлора

ротовой полости, которая представляет собой обширную экосистему [3]. Установлено, что колонизация слизистой ротовой полости условно-патогенными и патогенными бактериями в значительной степени повышает вероятность возникновения не только местных патологических изменений, но и служит причиной формирования различных соматических заболеваний.

Несмотря на очевидную актуальность, проблема распространения условно-патогенных и патогенных бактерий при различной патологии, в том числе у детей с онкогематологическими заболеваниями в условиях применяемой терапии, остается практически не исследованной.

Комплексное изучение микрофлоры ротовой полости у здоровых детей и детей с онкогематологическими заболеваниями, основанное на исследовании состава смешанных микробных биопленок, выделения и идентификации новых, ранее неизвестных микроорганизмов является целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Материал для исследования собирали у детей 2 групп в возрасте от 2 до 10 лет. В 1-ю группу входили пациенты с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии, не получавшие антибиотиков в течение последних 3 мес, со схожими протоколами лечения основного заболевания, находившиеся на лечении в дневном стационаре НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой. Вторая группа включала учеников начальных классов школ и воспитанников детских садов г. Санкт-Петербурга.

Питательные среды: LB, Мюллера–Хинтона, Шедлера, колумбийский, бруцелла-агары и бульоны (bio-Merieux, Франция и Oxoid, Великобритания).

Диски с антибиотиками для определения чувствительности к 18 антибактериальным препаратам (HiMedia, Индия, НИЦФ РФ).

Культивирование микроорганизмов проводили в аэробных и анаэробных условиях в течение 18–120 ч при температурах 35 и 37 °С в обычной атмосфере и с использованием CO₂-инкубатора MCO-19AC (Sanyo, Япония) и газогенераторных пакетов GENbag anaer (bio-Merieux, Франция).

Идентификация выделенных микроорганизмов выполнялась с учетом тинкториальных, морфологических, культуральных и биохимических свойств [4], а также по секвенированной последовательности гена *16S* рибосомальной РНК (рРНК) и полногеномного секвенирования генома.

Изучение морфологии колоний и клеток с помощью микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия), оснащенного иммерсионным объективом A-Plan 100×/1,25, окуляр 10× (Carl Zeiss, Германия). Макро и микрофотографии получали с помощью фотоаппарата Canon EOS 60D (Canon, Япония) с адаптером Photo adjustment 1,6× for Zeiss microscopes (Askania Mikroskop Technik Rathenow GmbH, Германия).

Электронная микроскопия выполнена на микроскопах JEM-100S (Jeol, Япония) при инструментальном увеличении ×1000–5000 и Libra100 (Carl Zeiss, Германия).

Определение биохимической активности микроорганизмов проводили с помощью системы Vitek 2 (bio-Merieux, Франция).

Идентификация бактерий по протеому бактериальной клетки выполнялась при помощи масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF с пробоподготовкой на микротитрационных планшетах AnchorChip (Bruker Corporation, США) с идентификацией относительно MALDI

Biotyper Database (Bruker Taxonomy Tree) (Bruker Corporation, США).

Идентификация бактерий по нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК проводилась с использованием баз данных HOMD 16S rRNA RefSeq v13.2, SILVA release 115 SSU Ref., NCBI 16S rRNA/WGS/Reference genomic sequences/nucleotide collection при помощи алгоритма megablast (blast v 2.2.28) [5]. Результаты поиска оценивали при помощи программы CLUSTALW [6].

Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли на плотной питательной среде диско-диффузионным методом и с помощью системы Vitek 2 с использованием идентификационных карт AST (bio-Merieux, Франция).

Отбор единичных бактериальных клеток из смешанных сообществ методом лазерной микродиссекции проводили с использованием системы PALM MicroBeam (Carl Zeiss, Германия) под контролем видеокамеры, роботизированной системы контроля лазера PALM RoboSoftware v 4.6.

Материалы для выделения ДНК и праймеры. Для выделения геномной ДНК бактерий фенол-хлороформным методом [7] использовали: фенол жидкий, уравновешенный 10 мМ трис-НСl pH 8,0, 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma-Aldrich, США); хлороформ, стабилизированный этанолом (Sigma-Aldrich, США); протеиназу К из *Tritirachium album* (Amresco, США); лизоцим из яичного белка (Amresco, США). Праймеры «универсальные» для амплификации гена *16S* рРНК: прямой – 27F 5'-AGAGTTTGGATCA TGGCTCAG-3', обратный – 1492R 5'-CGGTTACCT TGTTACGACTT-3' [8] (Евроген, Россия).

Секвенирование гена *16S* рРНК проводили с помощью набора BigDye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, США) и автоматического секвенатора ABI Prism Genetic Analyzer 3730XL (Applied Biosystems, США), а также программного пакета Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems, США).

Алайнмент гена *16S* рРНК и проверка сиквенса на формирование химер выполнены с использованием программ Geneious R8 (Biomatters Ltd., США), DECIPHER [9] и UCHIME [10].

Построение дендрограмм для филогенетического анализа выполнено на основе баз данных HOMD 16S rRNA RefSeq v13.2, SILVA release 115 SSU Ref., NCBI refseq_rna/WGS/Reference genomic sequences/nucleotide collection, алгоритма megablast и программы CLUSTALW, а также метода neighbour-joining [11]. Дендрограммы строили в программе ARB [12] или Geneious R8 (Biomatters Ltd., США), с использованием приложения PhyML [13].

Сиквэнс генома бактерий проведен набором TruSeq Rapid Cluster Kit – Paired-End and Single-Read (Illumina, США) согласно инструкции производителя, на секвенаторе Illumina HiSeq 2500 (Illumina, США) при конверсии исходных данных в fastq-формат с помощью программы BaseSpace (Illumina, США).

Сборка геномов бактерий выполнена с использованием программ Velvet v 1.2.10 [14], Mauve [15] с ресеквенированием участков, содержащих пробелы.

Аннотация генома в предварительном варианте сделана с помощью сервера RAST [16], полная – вручную с использованием программ GeneMarks [17], Infernal [18] и баз Rfam [19], Pfam [20], UniProt [21].

Статистическую обработку данных проводили с использованием интерактивного языка высокого уровня Octave [22] (критерии Стьюдента и Краскела–Уоллиса).

Результаты и обсуждение

Изучение состава микрофлоры ротовой полости здоровых детей и детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии проводили в одинаковых условиях с использованием стандартизованного набора описанных методов. В исследуемом материале обеих групп преобладали грамположительные кокки. В слюне здоровых детей было выявлено большее разнообразие морфотипов бактерий, также у них чаще встречались ветвистые и извитые формы, коккобациллы и грамтрицательные кокки. Клетки дрожжеподобных грибов встречались в половине мазков из слюны детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии и не встречались у здоровых детей.

При высевах исследуемого материала на питательные среды были получены многочисленные смешанные биопленки. По морфологии они были похожи на обычные изолированные колонии, образованные бактериями одного вида. Подобные смешанные микробные сообщества были нами ранее получены искусственным путем [23, 24]. Микроскопия мазков, приготовленных из этих биопленок, показала, что каждая из них содержит от 2 до 8 различных бактерий. В результате последовательных рассевов часть сме-

шанных биопленок удалось разделить и получить из них чистые культуры бактерий, пригодные для идентификации. В то же время большинство смешанных биопленок в использованных условиях разделить не удалось, образующие их бактерии росли только вместе. Это можно объяснить выраженной взаимозависимостью микробов, при которой внутри биопленок происходит обмен жизненно важными факторами, которые тот или иной микроорганизм не в состоянии продуцировать сам и которые отсутствуют в использованных питательных средах. Очевидно, что такие бактерии, относятся к «пока не культивируемым», поскольку имеющиеся методы не позволяют воспроизвести все условия, требующиеся данным микроорганизмам для роста в виде чистых культур.

Некоторые бактерии росли только в присутствии грибов. Такой симбиоз хорошо известен. Взаимодействие между грибами и патогенными бактериями привлекает большое внимание ученых, поскольку известно, что такие смешанные биопленки особенно устойчивы к воздействию противомикробных препаратов [25].

По результатам сравнения числа видимых и культивируемых бактерий слюны здоровых и больных детей можно заключить, что около 70 % микроорганизмов, выявленных при микроскопии, можно отнести к «пока не культивируемым», что соответствует современным результатам, получаемым при использовании различных методов.

Путем рассева смешанных микробных биопленок, полученных из слюны здоровых и больных детей, удалось выделить в виде чистых культур и идентифицировать по биохимической активности представителей 23 родов микроорганизмов. Среди них: 8 родов аэробных, 14 родов анаэробных бактерий и представители дрожжеподобных грибов рода *Candida* (рис. 1 и 2).

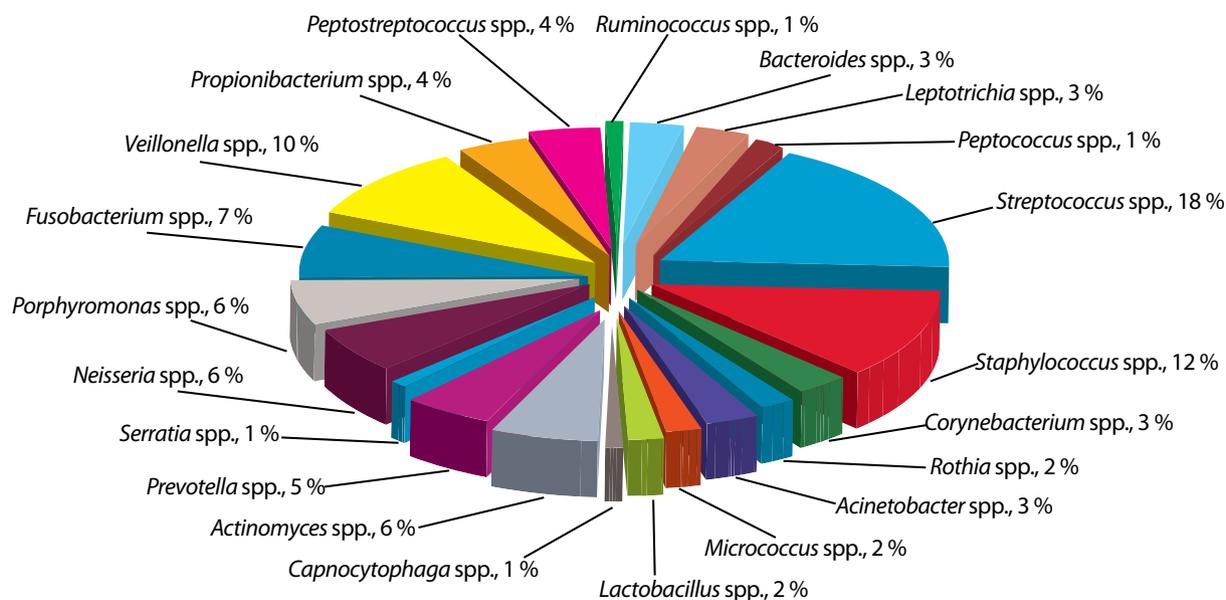


Рис. 1. Бактерии, выделенные из слюны здоровых детей

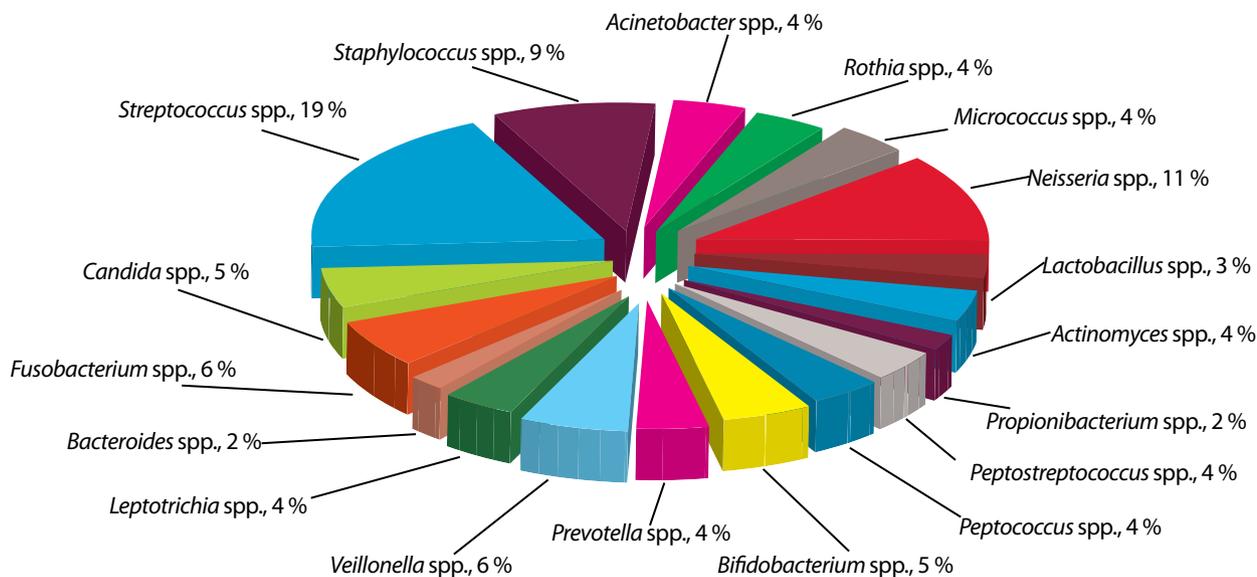


Рис. 2. Микроорганизмы, выделенные из слюны детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии

Поскольку в биопленках формируются условия для облегченного обмена генетической информацией, в том числе и генами, отвечающими за устойчивость к противомикробным препаратам [26], определение чувствительности к антибиотикам микроорганизмов, идентифицированных в слюне, позволяет сформировать представление о распространенности устойчивости к противомикробным препаратам среди детей.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании различий распространения антибиотикоустойчивости в микрофлоре здоровых и больных детей. В микробиоте последних обнаружено повышенное по сравнению со здоровыми детьми содержание устойчивых клонов. Так, в микрофлоре больных детей были бактерии, устойчивые к амикацину, меропенему, эритромицину, рокситромицину. В микробиоте здоровых детей такие штаммы отсутствовали. Вероятно, это связано с длительным применением противомикробных препаратов у детей с онкогематологическими заболеваниями в период лечения. Следует отметить, что распространение генов антибиотикоустойчивости среди представителей нормальной микрофлоры представляет потенциальную опасность, поскольку в микробиоте, идентифицированной в ротовой полости обследованных детей, обнаружены в том числе и условно-патогенные микроорганизмы.

Среди биопленок, полученных из слюны 6 детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии, были выявлены микробные сообщества, в которых преобладали грамположительные кокки. Эти сообщества имели воспроизводимый рост на использованных средах, что дало возможность их детального изучения. С помощью лазерной микродиссекции из этих кокков была выделена ДНК, получены и секвенированы гены *16S* рРНК. В результате установлено, что во всех образцах исследуемые грамположительные кокки имели идентичную последовательность гена,

кодирующего *16S* рРНК, сходную с таковой у некоторых стрептококков, в частности *Streptococcus oralis* (Uo5) NCBI FR720602 [27], *Streptococcus mitis* (B6) EMBL FN568063 [28], *Streptococcus pneumoniae* (R6) GenBank AE007317 [29], *Streptococcus pseudopneumoniae* IS7493 GenBank CP002925 [30].

Для определения родственных отношений изучаемой и известных бактерий были построены дендрограммы, отражающие родство с различными грамположительными стрептококками, данные о которых находятся в базах *refseq_rna* (NCBI) и *HOMD* (Human Oral Microbiome Database, База микробиомов полости рта человека). По результатам сравнения гена *16S* рРНК были получены противоречивые данные, в связи с чем в дальнейшем мы ориентировались на результаты сравнения с данными базы *HOMD*, поскольку последняя признана наиболее полным ресурсом данных о составе микрофлоры полости рта человека [31] (рис. 3).

Наиболее близкородственным к изолированному нами штамму оказался некультивируемый *Streptococcus* sp. *HOT_487* Entrez Link AY349414, при этом полного родства с ним обнаружено не было.

Для дальнейшего изучения наш штамм был изолирован путем культивирования на различных средах в аэробных и анаэробных условиях и изучен микробиологическими и биохимическими методами.

По данным световой микроскопии, эти бактерии представляют собой относительно крупные овальные грамположительные кокки, расположенные одиночно, парами или цепочками, состоящими из 3–4 бактерий. На электронограммах видно, что строение их клеточной стенки типично для грамположительных бактерий (рис. 4).

При изучении биохимических свойств выделенного штамма с использованием системы *Vitek 2* (bioMérieux) и идентификационной карты *GP* (грамположительные

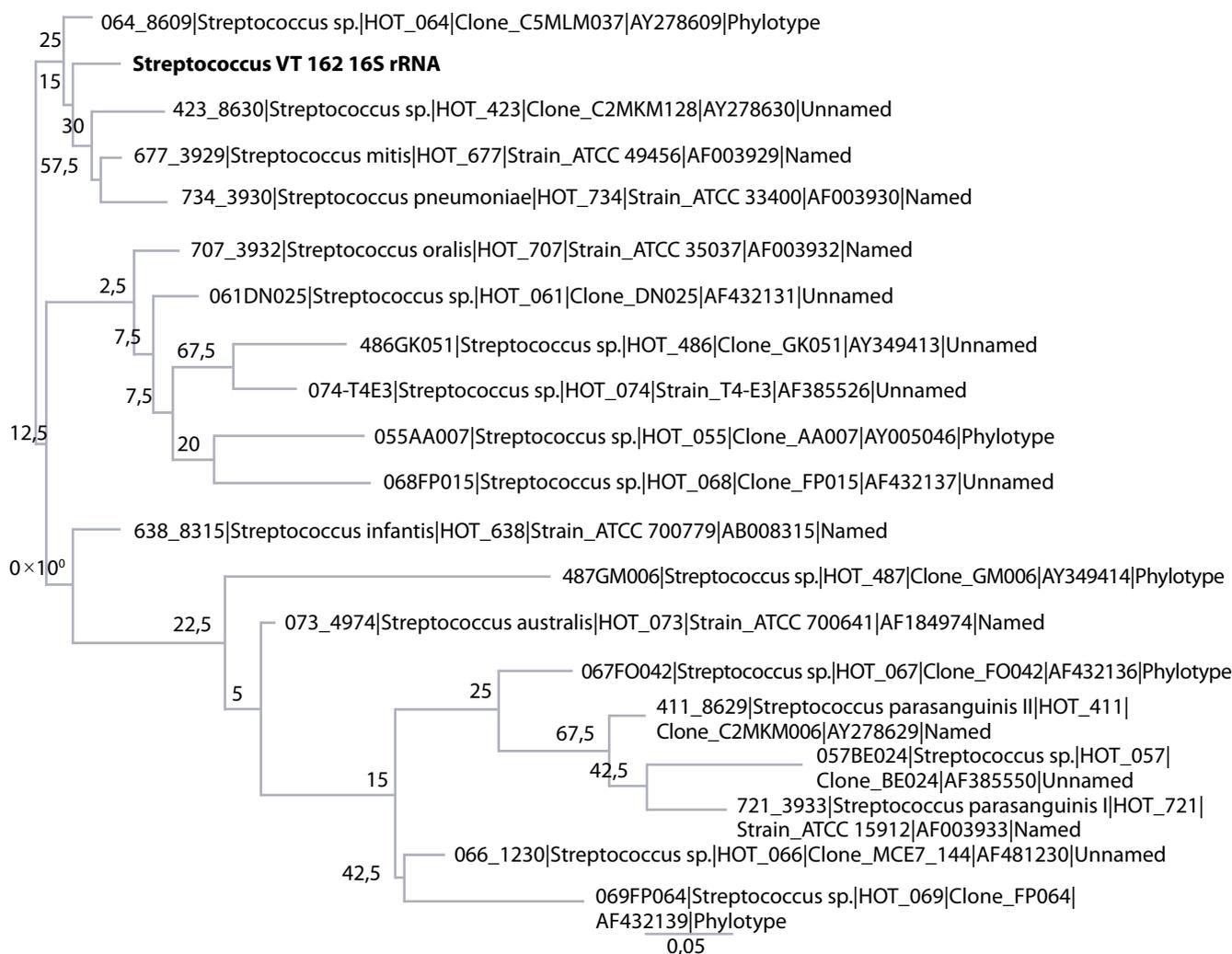


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основе базы HOMO

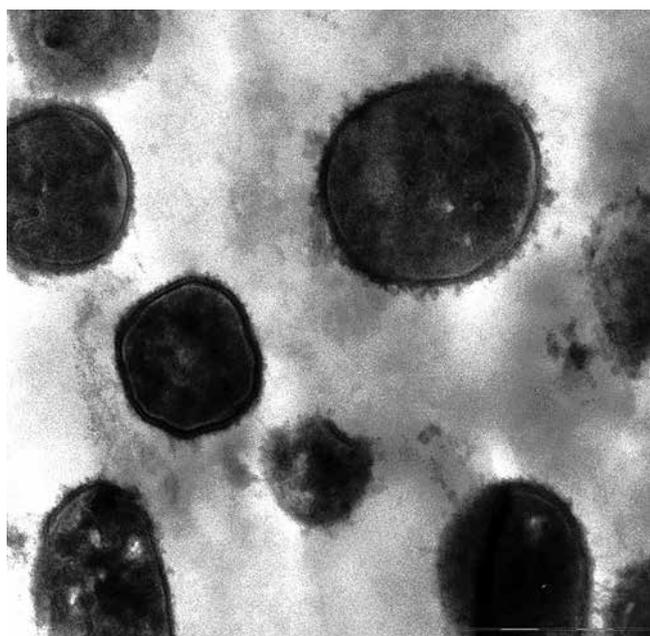


Рис. 4. Электронограмма грамположительных кокков, полученных в виде чистой культуры из биопленок, выделенных из слюны детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии

кокки), производящими исследование относительно 364 различных видов грамположительных кокков, микроорганизм был идентифицирован как *Granulicatella adiacens*. По результатам MALDI-TOF масс-спектрометрии, при которой полученные характеристики сравнивались с данными более чем 4000 видов бактерий [32], штамм был идентифицирован как *Streptococcus oralis*. При этом использованные анализаторы указывали на низкую достоверность дискриминации, не позволяющую точно идентифицировать микроб среди имеющихся в базе. Таким образом, по данным секвенса 16S рНК, биохимического и протеомного анализов микроб точно идентифицировать не удалось. При этом следует учитывать имеющиеся в литературе данные, что среди ряда стрептококков выявлены тесные взаимоотношения и даже между *Streptococcus pneumoniae* и стрептококками группы *Mitis*, в частности секвенс гена, кодирующего 16S рНК *Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis*, совпадает на 99 %, хотя сходство секвенсов полных геномов этих бактерий составляет приблизительно 60 % [33].

В связи с этим был проведен полногеномный секвенс изолированного штамма. В результате установ-

лен его размер, составляющий 2 045 418 п. о. с содержанием G+C, равным 41,1 %. Аннотация генома, проведенная вручную и с помощью сервера RAST, показала, что геном содержит 1935 белок-кодирующих последовательностей со средней длиной 909 п. о. Среди них были идентифицированы гены транспортеров, ассоциированных с полирезистентностью к противомикробным препаратам семейств ABC (ATP binding cassette), MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion), MFS (Major Facilitator Superfamily), DMT (Drug Metabolite Transporter), ген *vanZ*, связанный с устойчивостью к тейкопланину (антибиотик, относящийся к группе гликопептидов), гены бета-лактамаз класса A, фактора вирулентности MviN, адгезинов и экзотоксина – гемолизина III, а также гены белков биосинтеза капсулы CpsC и CpsI. Обращает на себя внимание, что некоторые гены антибиотикоустойчивости, обнаруженные в геноме данного штамма, не экспрессируются в условиях, использованных в данном исследовании.

Результаты виртуальной ДНК-ДНК гибридизации также свидетельствуют о сходстве изолированного штамма с бактериями рода *Streptococcus*, но он не может быть отнесен ни к одному из известных видов. Таким образом, по данным анализа полного генома изолированного

штамма можно заключить, что больше всего он похож на таковой у представителей рода *Streptococcus*, но принадлежит бактериям неизвестного пока вида.

Проведенные исследования показали, что существуют различия в составе микробиоты ротовой полости здоровых детей и детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии. Бактерии микробиоты детей с онкогематологическими заболеваниями содержат больше генов, контролирующих антибиотикоустойчивость. Кроме того, в составе их микробиоты обнаружены ранее неизвестные бактерии, которые после комплексного изучения были идентифицированы как представители неизвестного ранее вида стрептококков. Геном этих бактерий содержит гены, присущие патогенным и условно-патогенным бактериям, в первую очередь, кодирующие экзотоксин – гемолизин, адгезины и антибиотикоустойчивость. Обращает на себя внимание наличие большого числа генов, кодирующих устойчивость к широкому спектру лечебных препаратов, включая сравнительно редко применяемые пептидные препараты типа тейкопланина. Наличие большого количества генов устойчивости к различным препаратам у бактерии в микрофлоре детей позволяет предполагать, что данный штамм персистирует и передается среди больных онкогематологическими заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

- Sommer F., Bäckhed F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:227–38.
- Epstein S. *Microbiology monographs*. Springer Berlin Heidelberg, 2009. Pp. 10, 131–159.
- Zaura E., Keijsers B.J.F., Huse S.M., Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 2009;9:259.
- David B., Richard C. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1–5. Springer, 2012.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947–4.
- Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 440 с. [Miller D. *Experiments in molecular genetics*. M.: Mir, 1976. 440 p. (In Russ.)].
- Frank J.A., Reich C.I., Sharma S. et al. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:2461–70.
- Wright E.S., Yilmaz L.S., Nogueira D.R. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:717–25.
- Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011;27:2194–200.
- Wiley E.O., Lieberman B.S. *Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics*. John Wiley & Sons Inc., 2011. Available at <http://www.wiley.com>.
- Ludwig W., Strunk O., Westram R. et al. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1363–71.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 2010;59:307–21.
- Zerbino D.R. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Curr Protoc Bioinformatics* 2010; chapter 11, unit 11.5.
- Darling A.E., Mau B., Perna N.T. ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE* 2010;5:e11147.
- Aziz R.K., Bartels D., Best A.A. et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008;9:75.
- Besemer J., Lomsadze A., Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2607–18.
- Nawrocki E.P., Eddy S.R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics* 2013;29:2933–5.
- Burge S.W., Daub J., Eberhardt R. et al. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Res* 2013;41: D226–32.
- Finn R.D., Bateman A., Clements J. et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D222–30.
- UniProt Consortium. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 2014;42:D191–8.
- Eaton J.W., Bateman D., Hauberg S. A high-level interactive language for numerical computations (gnu.org, 2011).
- Tetz V.V. Colony-like communities of bacteria. *Microbios* 1994;80:63–5.
- Tetz V.V. Formation and structure of mixed bacterial communities. *APMIS* 1999;107:645–54.
- Morales D.K., Hogan D.A. *Candida albicans* interactions with bacteria in the

- context of human health and disease. PLoS Pathog 2010;6:e1000886.
26. Molin S., Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Curr Opin Biotechnol 2003;14:255–61.
27. Reichmann P., Nuhn M., Denapaite D. et al. Genome of *Streptococcus oralis* strain Uo5. J Bacteriol 2011;193: 2888–9.
28. Denapaite D., Brückner R., Nuhn M. et al. The genome of *Streptococcus mitis* B6 – what is a commensal? PLoS One 2010;5:e9426.
29. Hoskins J., Alborn W.E. Jr, Arnold J. et al. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. J Bacteriol 2001;183:5709–17.
30. Shahinas D., Tamber G.S., Arya G. et al. Whole-genome sequence of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolate IS7493. J Bacteriol 2011;193:6102–3.
31. Chen T., Yu W.H., Izard J. et al. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. Database (Oxford), 2010; baq013.
32. Schmitt B.H., Cunningham S.A., Dailey A.L. et al. Identification of anaerobic bacteria by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with on-plate formic acid preparation. J Clin Microbiol 2013;51:782–6.
33. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3: The Firmicutes. Springer, 2009.