

УДК 579.8:616.155.392-018.25]-053.2

Л. Г. ЛИТУНОВСКАЯ

## МИКРООРГАНИЗМЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ЛОКАЛЬНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ СЛИЗИСТЫХ У ДЕТЕЙ С ЛЕЙКОЗОМ

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,  
Минск, Беларусь

(Поступила в редакцию 13.11.2013)

**Введение.** За последние годы существенно расширились возможности лабораторной диагностики в подтверждении клинического диагноза. Однако по-прежнему вопрос целесообразности назначения тех или иных видов исследований требует согласованных действий лабораторной службы и лечащего врача. Это связано, на наш взгляд, не только с затратами на выполнение анализа, но и с пониманием того, какой тип биологического материала нужно отбирать и какие виды лабораторных тестов предпочтительнее проводить в каждом конкретном случае. Не менее важным критерием является интерпретация полученного результата, исходя из оценки клинического статуса пациента и степени достоверности самого лабораторного исследования.

Основное правило отбора биологических проб при проведении микробиологических анализов подразумевает изучение локусов, в которых есть признаки воспаления [1, 2]. Принято считать, что у онкогематологических больных на фоне проводимого специфического лечения отсутствуют четко выраженные локальные очаги, а единственным проявлением инфекции может быть только лихорадка [3]. У таких пациентов основными факторами риска развития осложнений становятся нейтропения [4] и нарушения иммунного статуса различной степени выраженности, а этиологической причиной инфекционного процесса может стать любой микроорганизм [5–9]. Стандартная практика лечащего врача в этом случае направлена на отбор проб с кожи и слизистых пациента с целью обнаружения возможного возбудителя [10–12].

Цель работы – изучение видового разнообразия микроорганизмов, которые колонизируют кожу и слизистые у детей с диагнозом острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), на фоне проводимого специфического лечения, а также попытка выявления связи между фактом развития локального воспаления и обнаружением бактерий в очаге.

**Материалы и методы исследования.** В исследовании ретроспективно было проанализировано 127 историй болезней пациентов в возрасте от 1 до 18 лет с диагнозом ОЛЛ (первично выставлен в 2008–2010 гг.), получавших лечение по протоколу ОЛЛ-МБ-2008 в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Для оценки микробиологического статуса нами изучены результаты бактериологических исследований образцов, отобранных из пищеварительного тракта (отделяемое из ротовой полости – 421 проба, содержимое кишечника – 513 проб), а также биологического материала, собранного с кожи и слизистых наружных половых органов (НПО) (143 пробы).

Объем стандартных исследований для каждого типа биоматериала включал посев на селективные питательные среды с целью выделения микроорганизмов, которые могли бы иметь диагностическое значение в данном локусе [13, 14]. Для образцов кишечного содержимого анализ подразумевал поиск по следующим параметрам: абсолютные патогены (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*), неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ), *S. aureus*, грибы, наличие (отсутствие) в пробе представителей семейства Enterobacteriaceae. Для ротовой полости схема исследо-

вания включала выделение таких микроорганизмов, как стрептококки групп А и С, коринебактерии (*C. diphtheriae*, *A. haemolyticum*), *S. aureus*, *Haemophilus spp.*, НГОБ, энтеробактерии, грибы, а также определение наличия (отсутствия) в образце представителей сапрофитной микрофлоры (*Streptococcus spp.*, *Neisseria spp.*, прочих грамположительных микроорганизмов). Для образцов, отобранных с НПО, объем исследований был направлен на выделение НГОБ и энтеробактерий, стафилококков и энтерококков, коринебактерий и грибов.

Дополнительно учитывали уровень лейкоцитов в периферической крови на дату отбора пробы ( $\pm 1$  день) для бактериологического исследования и наличие (отсутствие) лихорадки и признаков воспаления в локусе в этот период. За лейкопению принимали значения, соответствующие IV степени по шкале токсичности CTC-NCI (Clinical Trial Centre, National Cancer Institute, Канада) [15].

Признаки возможного воспаления для каждого локуса оценивали на основании жалоб и осмотра, не учитывая степень выраженности патологического процесса [15]. Для поражений кишечника признаками поражения были абдоминальная боль, вздутие, диарея или запор, для ротовой полости – состояние слизистой (присутствие следующих дефектов: покраснение, изъязвление, налеты и т. п., дополнительно – боль и кашель), для кожи и слизистых наружных половых органов степень – воспаление кожи, слизистых и вовлечение в патологический процесс подкожно-жировой клетчатки и мышц.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel и STATISTICA 6.0. Для оценки влияния признаков друг на друга был проведен корреляционный анализ по Спирману. Достоверность различий определяли с помощью  $\chi^2$ . Различия считали значимыми при  $p < 0,05$  с учетом поправки Йетса.

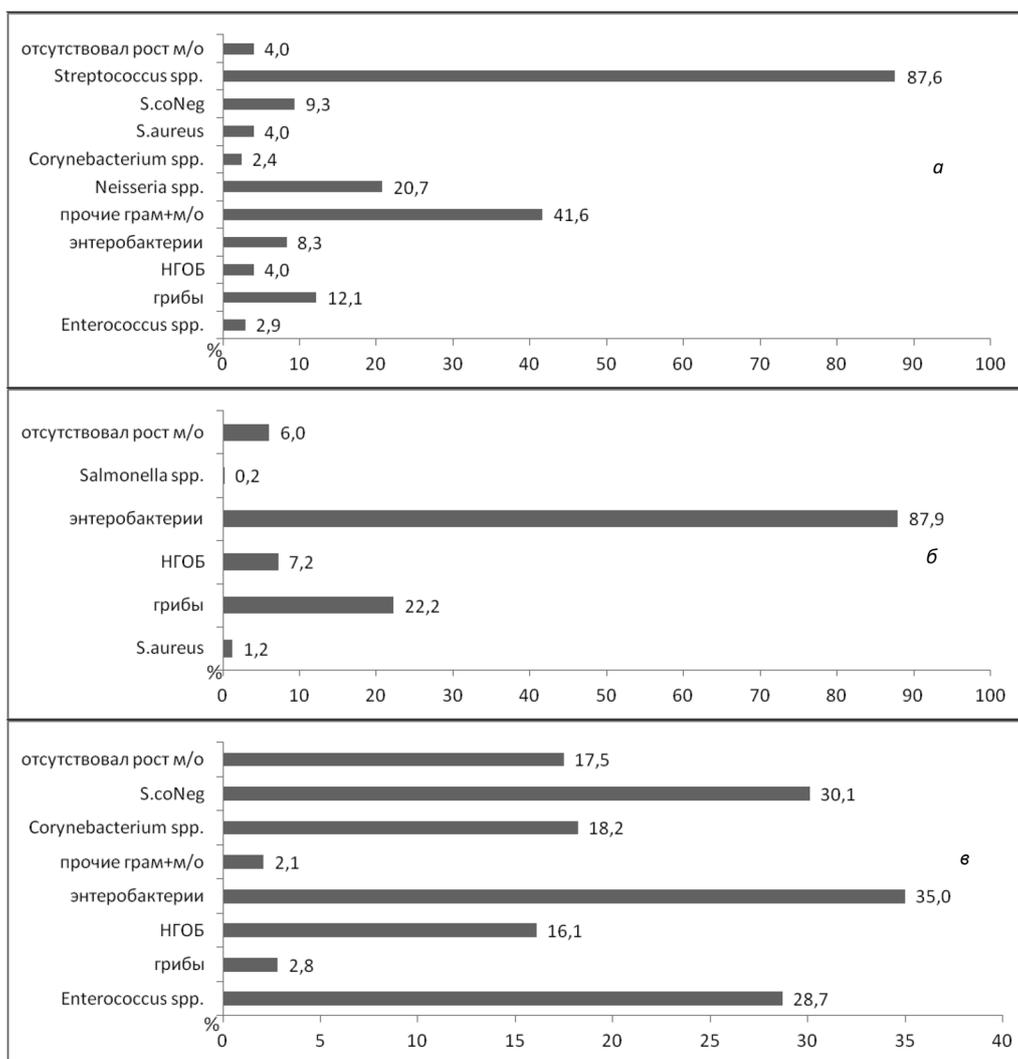
**Результаты и их обсуждение.** Видовой состав изучаемых микробиотопов у пациентов с ОЛЛ отражен на рисунке.

Биологические образцы для анализа отбирали из заведомо не стерильных локусов. Отрицательные результаты, полученные при их исследовании, указывали на возможные ошибки при выборе типа и метода сбора материала, его хранения и транспортировки, а также на необходимость проведения микробиологического обследования в период антимикробной терапии. В 25 (17,5 %) пробах из 143, отобранных с НПО, отсутствовал рост микроорганизмов. При анализе образцов кишечного содержимого в 82 (14,5 %) случаях из 564 также отсутствовал рост бактерий на всех питательных средах. Из статистики нами исключены анализы (всего 51), взятые из ануса с помощью микробиологического тампона, при тестировании которых не обнаружили роста бактерий на селективных средах (их посчитали некорректно собранными). Таким образом, в 6 % образцов кишечного содержимого не наблюдалось роста микроорганизмов, что могло косвенно свидетельствовать о низкой концентрации бактерий в материале из-за воздействия антибиотиков или усиленной перистальтики кишечника. При обследовании ротовой полости в 4 % случаев результаты бактериологических исследований также были неинформативными.

Полученные результаты указывали на то, что микроорганизмы – возбудители инфекционных заболеваний не влияют на развитие локальных поражений у детей с ОЛЛ, так как только в одном случае при госпитализации ребенка в стационар была обнаружена *S. enteritidis*.

Видовой состав биотопов у пациентов с ОЛЛ свидетельствовал о преобладании собственных сапрофитных микроорганизмов в локусах. Для ротовой полости это были стрептококки (87,6 %), прочие грамположительные микроорганизмы (41,6 %), нейссерии (20,7 %) и стафилококки (13,3 %). В кишечнике базовой флорой были энтеробактерии (87,9 % случаев). На коже и слизистых НПО чаще всего обнаруживались коринебактерии (18,2 %), энтерококки (28,7 %), стафилококки (30,1 %) и энтеробактерии (35 %).

В табл. 1 представлены данные о взаимосвязи между уровнем лейкоцитов, наличием лихорадки и симптомов локального поражения. Клинические проявления воспаления в ротовой полости и поражение кишечника, проявляющееся диареей, не зависели от тяжести лейкопении. При обследовании НПО при лейкоцитах менее 1000/мкл признаки повреждения фиксировали в 6 (27,3 %) пробах из 22, при других уровнях лейкоцитов – в 7 (5,9 %) пробах из 118 ( $p = 0,006$ ). Не было выявлено связи между наличием лихорадки и клиническими проявлениями поражений в изучаемых локусах.



Микроорганизмы, обнаруженные в образцах с кожи и слизистых у детей с ОЛЛ: а – отделяемое из ротовой полости; б – кишечное содержимое; в – пробы с кожи и слизистых НПО

Т а б л и ц а 1. Наличие визуальных признаков локального поражения у детей с ОЛЛ при уровне лейкоцитов менее 1000/мкл и лихорадке

Показатель	Ротовая полость			Кишечник			НПО		
	Стоматит			Диарея			Признаки повреждения		
	Да	Нет	p	Да	Нет	p	Да	Нет	p
L < 1000/мкл	12 (5,9 %)	10 (4,8 %)	0,791	11 (9,6 %)	19 (5,1 %)	0,122	6 (26,1 %)	7 (5,8 %)	0,006
Всего проб	205	209		114	373		23	120	
Лихорадка	62 (29,4 %)	47 (22,4 %)	0,126	36 (29,5 %)	82 (21 %)	0,067	7 (30,4 %)	26 (21,7 %)	0,52
Всего проб	211	210		114	373		22	118	

Для установления возможной этиологической роли микроорганизмов в развитии воспаления была проанализирована частота обнаружения бактерий в материале в зависимости от наличия признаков поражения на коже и слизистых (табл. 2). В исследование были включены такие микроорганизмы, как НГОБ (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*), энтеробактерии, грибы, *S. aureus*, энтерококки. Перечисленные виды могут встречаться в биотопах организма человека транзиторно (например, НГОБ) либо являться базовой флорой некоторых локусов (энтеробактерии и энтерококки для кишечника) [1, 2, 16]. При клинике стоматита у детей с ОЛЛ в биологическом материале из

ротовой полости достоверно чаще выделялись грибы ( $p = 0,018$ ), энтеробактерии ( $p = 0,005$ ) и энтерококки ( $p = 0,041$ ). Не было установлено связи между расстройством стула, проявляющимся диареей, и наличием (отсутствием) исследуемых бактерий в пробах. При обследовании НПО синегнойная палочка в образцах, имеющих признаки повреждения, была выделена в 6 (26,1 %) из 23 случаев, в то время как в материале без клинических проявлений, который был отправлен в лабораторию, – в 7 (5,8 %) из 120 ( $p = 0,007$ ). Прочие бактерии в этом локусе в одинаково равной мере могли встречаться как при наличии, так и при отсутствии визуальных проявлений поражения.

Т а б л и ц а 2. Наличие визуальных признаков поражения у детей с ОЛЛ в зависимости от обнаруженных в локусе микроорганизмов

Пробы	Ротовая полость			Кишечник			НПО		
	Стоматит			Диарея			Признаки повреждения		
	Да	Нет	$p$	Да	Нет	$p$	Да	Нет	$p$
Всего проб	211	210		122	391		23	120	
<i>P. aeruginosa</i>	1 (0,5 %)	3(1,4 %)	0,612	7 (5,7 %)	17 (4,3 %)	0,697	6 (26,1 %)	7 (5,8)	0,007
<i>A. baumannii</i>	5 (2,4 %)	2 (1 %)	0,45	1 (0,8 %)	4 (1 %)	0,743	2 (8,7 %)	6 (5 %)	0,84
Энтеробактерии	26 (12,3 %)	9 (4,3 %)	0,005	20 (16,4 %)*	42 (10,7 %)*	0,13	12 (52,2 %)	38 (31,7 %)	0,099
Грибы	34 (16,1 %)	17 (8 %)	0,018	34 (27,9 %)	80 (20,5 %)	0,111	0	4 (3,3 %)	0,843
<i>S. aureus</i>	11 (4,5 %)	6 (4,1 %)	0,327	1 (0,8 %)	5 (1,3 %)	0,944	0	0	–
Энтерококки	10 (9,1 %)	2 (2,6 %)	0,041	–	–		5 (21,7 %)	36 (30 %)	0,582

Пр и м е ч а н и е. \* – отсутствие роста микроорганизмов в биологических пробах.

Частота «положительных находок» микроорганизмов в локусах не зависела от уровня лейкоцитов в периферической крови и наличия лихорадки (табл. 3, 4). Исключение составили грибы, колонизация кишечника которыми при лейкопении IV степени составила 12 (40 %) случаев из 30, тогда как при других значениях лейкоцитов они обнаруживались в 94 (20,6 %) случаях из 457 ( $p = 0,023$ ).

Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии непосредственного влияния условно-патогенных микроорганизмов, включенных в исследование, в развитии локальных патологических процессов слизистых пищеварительного тракта. Случаи, когда была получена статистически достоверная связь между фактом обнаружения бактерий в пробе и наличием признаков поражения (например, появление энтеробактерий и энтерококков в ротовой полости), могли быть обусловлены их транслокацией из кишечника под влиянием основного лечения и никак не ассоциировались с собственно вирулентными свойствами самих бактерий [17]. По данным других авторов, колонизация грамотрицательными бактериями ротовой полости характерна для пациентов с онкогематологической патологией за счет персистенции госпитальной микрофлоры, обладающей множественной лекарственной устойчивостью [18].

Роль микроорганизмов в развитии патологических процессов в локусах вторична и связана в первую очередь с нарушением иммунного статуса [19]. Обнаружение грибов на слизистых также характерно для пациентов с гемобластомами и зависит от особенностей основного лечения и применения антибиотиков широкого спектра действия. Отсутствие четких визуальных критериев воспаления бактериальной или грибковой этиологии не позволяет рассматривать роль последних в развитии локального поражения как главную [20]. Способности бактерий вызывать инфекционные осложнения связаны с возможностью продуцировать определенные факторы вирулентности, которые не видоспецифичны и обусловлены функционированием макроорганизма [21, 22]. Попытка моделирования микробиоценоза *in vitro* неизбежно приводит к созданию более привилегированных условий для одних видов и угнетению или невозможности роста для других [23, 24]. Все это свидетельствует о необходимости более строгого подхода к оценке этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов, обнаруживаемых на коже и слизистых при проведении микробиологических тестов.

В нашем исследовании была подтверждена роль *P. aeruginosa* как оппортунистического патогена при развитии поражений НПО у детей с ОЛЛ [25–27]. Природная устойчивость к химио-

препаратам дает синегнойной палочке селективные преимущества по сравнению с прочими микроорганизмами, а наличие факторов вирулентности (подвижность, токсинообразование и синтез гидролитических ферментов) на фоне отсутствия механизмов иммунной защиты и нарушения целостности барьеров кожи и слизистых вызывает инфекционные осложнения, особенно при нейтропении [28, 29].

Т а б л и ц а 3. Частота обнаружения микроорганизмов в локусах у детей с ОЛЛ при уровне лейкоцитов менее 1000/мкл

Пробы	Ротовая полость			Кишечник			НПО		
	Да	Нет	<i>p</i>	Да	Нет	<i>p</i>	Да	Нет	<i>p</i>
Всего проб	22	392		30	457		13	127	
<i>P. aeruginosa</i>	1 (4,5 %)	3 (0,8 %)	0,52	4 (13,3 %)	20 (4,4 %)	0,078	3 (23,1 %)	8 (6,3 %)	0,11
<i>A. baumannii</i>	1 (4,5 %)	6 (15,3 %)	0,828	2 (6,7 %)	3 (0,7 %)	0,026*	2 (15,4 %)	6 (4,7 %)	0,342
Энтеробактерии	4 (18,2 %)	30 (7,7 %)	0,177	4(13,3%)**	53(11,6%)**	0,995	2 (15,4 %)	47 (37 %)	0,211
Грибы	1 (4,5 %)	49 (12,5 %)	0,437	12 (40 %)	94 (20,6 %)	0,023	1 (7,7 %)	3 (2,4 %)	0,822
<i>S. aureus</i>	1 (4,5 %)	16 (4,1 %)	0,656	0	6 (1,3 %)	0,824	0	0	–
Энтерококки	2 (9,1 %)	10 (2,6 %)	0,26	–	–	–	3 (23,1 %)	38 (29,9 %)	0,844

П р и м е ч а н и е. \* – полученные значения не учитывались из-за небольшой выборки (1 % от всех проб); \*\* – отсутствие роста микроорганизмов в биологических пробах.

Т а б л и ц а 4. Частота обнаружения микроорганизмов в локусах у детей с ОЛЛ в зависимости от наличия лихорадки

Пробы	Ротовая полость			Кишечник			НПО		
	Лихорадка		<i>p</i>	Лихорадка		<i>p</i>	Лихорадка		<i>p</i>
	Да	Нет		Да	Нет		Да	Нет	
Всего проб	109	312		118	395		33	110	
<i>P. aeruginosa</i>	0	4 (1,3 %)	0,539	7 (5,9 %)	17 (4,3 %)	0,627	5 (15,2 %)	8 (7,3 %)	0,3
<i>A. baumannii</i>	3 (2,8 %)	4 (1,3 %)	0,55	2 (1,7 %)	3 (0,8 %)	0,709	3 (9,1 %)	5 (4,5 %)	0,572
Энтеробактерии	13 (11,9%)	22 (7,1 %)	0,166	11 (9,3%)*	51 12,9%* <sup>*</sup>	0,374	9 (27,3 %)	41 (37,3 %)	0,396
Грибы	16 (14,7%)	35 (11,2 %)	0,434	29 (24,6 %)	85 (21,5 %)	0,565	1 (3 %)	3 (2,7 %)	0,611
<i>S. aureus</i>	6 (5,5 %)	11 (3,5 %)	0,535	3 (2,5 %)	3 (0,8 %)	0,275	0	0	–
Энтерококки	4 (3,7 %)	8 (2,5 %)	0,793	–	–	–	11 (33,3 %)	30 (27,3 %)	0,647

П р и м е ч а н и е. \* – отсутствие роста микроорганизмов в биологических пробах.

**З а к л ю ч е н и е.** Полученные нами результаты свидетельствуют о низкой роли микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний в развитии локальных патологических процессов кожи и слизистых у детей с ОЛЛ. Основные факторы риска (нейтропения и лихорадка) для развития инфекционных осложнений у детей с лейкозами на фоне основного лечения также не оказывали существенного влияния на выраженность клинических проявлений нарушений со стороны пищеварительного тракта. На наш взгляд, необходимо с осторожностью подходить к определению этиологической роли микроорганизмов, которые были обнаружены в результате микробиологических исследований, в нестерильных при нормальных условиях локусах при наличии в них признаков воспаления. Риск развития повреждений кожи и слизистых наружных половых органов у детей с ОЛЛ был ассоциирован с инвазией *P. aeruginosa*, особенно в период нейтропении.

## Литература

1. Miller J. Michael // Specimen Management in Clinical Microbiology. 2nd ed. Washington, 1999.
2. Murrey R. Patrick // Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, 2003.
3. Phillips Bob, Selwood Karen, Lane M. Sheila et al. // Arch. Dis. Child. 2007. Vol. 92. P. 495–498.
4. Mendes Ana Verena Almeida, Sapolnik Roberto, Mendonça Núbia // J. de Pediatria. 2007. Vol. 83, N 2. P. 54–63.
5. Freifeld G. Alison, Bow J. Eric, Sepkowitz A. Kent et al. // Clin. Infect. Dis. 2011. Vol. 52, N 4. P. 56–93.
6. Kannangara Saman // Comm. Oncol. 2006. Vol. 3, N 9. P. 585–591.

7. *Rolston Kenneth V. I.* // Iran. J. of Clin. Infect. Dis. 2009. Vol. 4, N 2. P. 115–122.
8. *Chang Tai-Tsung, Lin Pei-Chin* // Novel Aspects in Acute Lymphoblastic Leukemia. 2011. November. P. 102–116.
9. *Chandran Rekha, Hakki Morgan, Spurgeon Stephen* // Infections in Leukemia. 2012. Ch. 17. P. 333–368.
10. *Румянцева Ю. В., Мансурова Е. Г., Варфоломеева С. Р.* и др. // Педиатрия. 2008. Т. 87, № 2. С. 66–74.
11. *Meckler Garth, Lindemulder Susan* // Emerg. Med. Clin. N. Am. 2009. N 27. P. 525–544.
12. *Roongroovapatr Pitiya, Suankratay Chusana* // J. Med. Assoc. Thai. 2010. Vol. 93, N 7. P. 776–782.
13. *Тең В. В.* // Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов. СПб., 2006. – 128 с.
14. *Murrey R. Patrick* // Clinical Microbiology. 2nd ed. Washington, 1998.
15. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0. 2009. May 28.
16. *Симонова Е. В., Пономарева О. А.* // Сиб. мед. журн. 2008. № 8. С. 20–25.
17. *Белоусова Е. А.* // Фарматека. 2009. № 2. С. 8–16.
18. *Los Renata, Rybojad Pawel, Gozdzik Kazimierz, Malm Anna* // New Microbiologica. 2008. N 31. P. 507–512.
19. *Blijlevens M. A. Nicole, Logan M. Richard, Netea G. Mihai* // J. of Antimicrob. Chemother. 2009. Vol. 63. Suppl. 1. P. 36–40.
20. *Ларионова В. Б., Быков Д. А.* // Онкогематология. 2007. № 1. С. 62–71.
21. *Сидоренко С. В.* // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. 2001. Т. 3, № 4. С. 301–315.
22. *Голуб А. В.* // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. 2012. Т. 1, № 4. С. 23–29.
23. *Николаев Б. А., Плакунов В. К.* // Микробиология. 2007. Т. 76, № 2. С. 149–163.
24. *Лямин А. В., Боткин Е. А., Жестков А. В.* // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. 2012. Т. 1, № 4. С. 17–22.
25. *Rossolini G. M., Mantengoli E.* // Clin. Microbiol. and Infection. 2005. Vol. 11. Suppl. 4. P. 17–32.
26. *Thirumala Raghukumar, Ramaswamy Madhusudanan, Chawla Sanjay* // Crit. Care Clin. 2010. N 26. P. 59–91.
27. *Cortés A. Jorge, Cuervo Sonia, Gómez A. Carlos et al.* // Biomédica. 2013. N 33. P. 70–77.
28. *Zuckermann Joice, Stoll Paula, Lieberknecht Meneghel Rosane et al.* // Revista HCPA. 2012. Vol. 32, N 3. P. 261–268.
29. *Шагинян И. А., Чернуха М. Ю.* // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2005. Т. 7, № 3. С. 271–285.

*L. LITUNOUSKAYA*

## **MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH THE LOCAL DEFECTS OF THE MUCOUS MEMBRANES IN CHILDREN WITH LEUKEMIA**

### **Summary**

The retrospective analysis of the interrelation between the data of the clinical status of children with acute lymphoblastic leukemia and the microorganisms, which have been revealed in the tested biological samples, has been carried out. Microorganisms-activators of infectious diseases are not the reason for the development of skin defects and mucous membranes in the basic treatment. The development of pathological processes on the mucous membranes of the digestive tract is not directly connected with the etiological role of the conditional-pathogenic microorganisms colonizing the loci (mouth, intestines) and also with the presence of leucopenia and fevers during this period. The risk of developing the inflammation of external genitals is associated with the invasion of the mucous membranes of *P. aeruginosa*, especially at granulopenia.