

Elżbieta Wojdat ¹, Krzysztof Kwiatek ¹, Henryk Zdrojewski ², Lidia Krupa ²

ZACHOROWANIE NA ZGORZEL GAZOWĄ – OPIS DIAGNOZOWANIA PRZYPADKU

¹Zakład Higieny Środków Żywności Zwierząt,
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Kierownik: Krzysztof Kwiatek

² Oddział Chirurgiczny, 6 Szpital Wojskowy w Dęblinie,
Ordynator: Henryk Zdrojewski

*W pracy opisano przypadek zgorzeli gazowej po amputacji kończyny dolnej u 69-letniego mężczyzny cierpiącego na cukrzycę. Do diagnostyki zastosowano szybką metodę opartą o technikę PCR, która umożliwiła wykrycie genów odpowiedzialnych za kodowanie toksyn produkowanych przez drobnoustroje z gatunku *Clostridium perfringens*.*

Słowa kluczowe: Clostridium perfringens, zgorzel gazowa, multiplex PCR
Key words: Clostridium perfringens, gas gangrene, multiplex PCR

WSTĘP

Beztlenowe laseczki *Clostridium perfringens* stanowią grupę drobnoustrojów powszechnie występującą w glebie oraz przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt (1,2). *Clostridium perfringens* typ A jest czynnikiem etiologicznym zgorzeli gazowej u ludzi i zwierząt oraz martwiczego zapalenia jelit i toksemii pochodzenia jelitowego u zwierząt, a produkowana przez niego toksyna alfa (α) o właściwościach lecytynazy oraz hemolizyny odpowiada za chorobotwórczość tego drobnoustroju. W wyniku zakażenia rany tym drobnoustrojem (lub jego sporami) dochodzi do zniszczenia tkanki, jej niedokrwienia i niedotlenienia. Okres od zakażenia rany laseczkami zgorzeli gazowej do wystąpienia pierwszych objawów, jakimi są silny ból i obrzęk rany, waha się od kilku do kilkudziesięciu godzin. Natężenie miejscowego bólu i późniejszych objawów zależy od tego, czy zakażeniu uległa tylko skóra i tkanka podskórna czy również tkanka mięśniowa. Z rany sączy się wydzielina o barwie od przezroczystej do krwistobrunatnej. Objawy towarzyszące to silny i twardy obrzęk tkanek otaczających ranę, będący wynikiem wyniszczającego działania toksyny kappi (kolagenazy). W tkankach otaczających ranę dochodzi ponadto do zakrzepów w drobnych naczyniach krwionośnych. Przy uciskaniu zakażonej rany wyczuwa się trzeszczenie banieczek gazu wytwarzanego przez *C. perfringens*. Po kilku godzinach od wystą-

pienia pierwszych objawów obserwuje się bardzo często wysoką gorączkę, wymioty, ból brzucha, krwistą biegunkę.

Niniejsza praca jest opisem przypadku klinicznego zgorzeli gazowej u człowieka, od którego wyizolowano *C. perfringens* oraz określono jego cechy fenotypowe i genotypowe.

MATERIAŁ I METODY

Historia choroby. Pacjent w wieku 69 lat, był leczony od kilku lat z powodu cukrzycy insulinozależnej. Martwica palców I i II stopy lewej z odczynem zapalnym połowy śródstopia była wskazaniem do przeprowadzenia zabiegu amputacji kończyny dolnej na wysokości stawu Choparta. Po pięciu miesiącach od amputacji pojawiły się następujące objawy: ból, stany podgorączkowe, obrzęk w okolicy stawu skokowego sięgający na podudzie. Zastosowana terapia antybiotykami, lekami przeciwbólowymi i poprawiającymi ukrwienie nie przyniosła poprawy, co zdecydowało o amputacji kończyny na wysokości 1/3 podudzia (makroskopowa granica stanu zapalnego). Po początkowej poprawie stanu pacjenta, czwartego dnia zaobserwowano znaczne pogorszenie stanu amputowanej kończyny, czemu towarzyszył obrzęk kikuta i stawu kolanowego oraz wyczuwalne trzeszczenia pod skórą. W wyniku wstrząsu septycznego pacjent zmarł. Materiał do badań stanowiły wymazy pobrane z rany pooperacyjnej kikuta kończyny dolnej i z kolana.

Izolowanie i identyfikacja szczepów *Clostridium perfringens*. Pobrane wymazy z rany pooperacyjnej posiano do zregenerowanego (100°C/10 min.) bulionu Wrzoska. Po 24-godzinnej inkubacji w warunkach beztlenowych (AnaeroGen, Oxoid) w temperaturze 37°C próbki, próbowki w których stwierdzono zmętnienie pożywki i obecność gazu w probówce Durhama były przesiewane na pożywki agarowe: Willis-Hobbs'a i na agar z krwią baranią. Posiewy inkubowano w warunkach beztlenowych i tlenowych (kontrola tlenowa) w temperaturze 37°C przez 24 h. Kolonie podejrzane o przynależność do *Clostridium perfringens* (wywołujące hemolizę na agarze z krwią baranią i dające reakcję Naglera na agarze Willis-Hobbs) były oczyszczane, a następnie poddane testom biochemicznym (Rapid ID 32 A, BioMérieux) oraz testowi na antybiotykowrażliwość (ATB ANA, BioMérieux). Detekcję genów kodujących toksyny główne i enterotoksynę przez wyizolowane szczepy *Clostridium perfringens* przeprowadzono z zastosowaniem reakcji multipleks PCR (3). Dobrane odpowiednio primery umożliwiały amplifikację genów: alfa (*cpa*), beta (*cpb*), beta2 (*cpb2*), epsilon (*etx*), jota (*iap*) oraz enterotoksyny (*cpe*), potencjalnie obecnych u badanych szczepów. Rozmiar otrzymanych produktów był porównywany z markerem O'Gene Ruler 100bp DNA (Fermentas).

WYNIKI

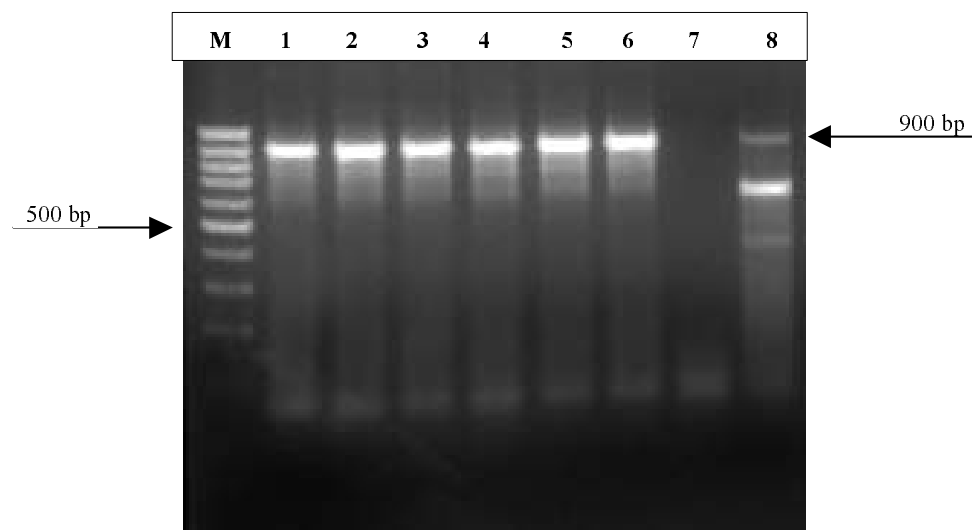
Na podstawie badania mikroskopowego wyizolowane szczepy zakwalifikowano do laseczek Gram-dodatnich. Badanie cech biochemicznych wyizolowanych szczepów potwierdziło ich przynależność do gatunku *Clostridium perfringens* (tab. I). Badanie antybiotykowrażliwości wykazało oporność szczepów na oksycylinę oraz wrażliwość na penicylinę, amoksycylina+kwas klawulanowy, piperacylina+tazobactam, tikarcylicyna+kwas klawulanowy, cefoksitin, cefotetan, imipenemę, klindamycynę, chloramfenikol, amoksycylinę, amoksycylina+kwas klawulanowy, tikarcylinę i metronidazol. Przy użyciu techniki PCR

Tabela I. Wyniki badań cech biochemicznych wyizolowanych szczepów *Clostridium perfringens*

Table I. Biochemical reactions results of *Clostridium perfringens* isolates

Nr. szczepu	Badana cecha biochemiczna																													
	URE	ADH	alfa GAL	beta GAL	beta GP	alfa GLU	beta GLU	alfa ARA	beta GUR	beta NAG	MNE	RAF	NIT	IND	PAL	ArgA	ProA	LGA	PheA	LeuA	PyrA	TyrA	AlaA	GlyA	GDC	alfa FUC	HisA	GGA	SerA	
1	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

amplifikowano gen o długości 900 par zasad (*cpa*) odpowiedzialny za kodowanie toksyny alfa (CPA) u wyizolowanych szczepów, co pozwoliło na zakwalifikowanie izolatów do typu A *Clostridium perfringens*, odpowiedzialnego za wywoływanie zgorzeli gazowej (ryc. 1). W przeprowadzonej reakcji multiplex PCR nie otrzymano innych genów odpowiedzialnych za kodowanie pozostałych toksyn głównych i enterotoksyny u tego gatunku drobnoustrojów (beta – *cpb*, beta2 – *cpb2*, epsilon – *etx*, iota – *iap*, enterotoksyna – *cpe*).



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji multiplex PCR wyizolowanych szczepów *Clostridium perfringens*. Ścieżka M – O'Gene Ruler 100 bp DNA marker (Fermentas), ścieżki 1, 2, 3, 4, 5, 6 – wyizolowane szczepy *C. perfringens* typ A; ścieżka 7 – kontrola ujemna, ścieżka 8 – kontrola dodatnia

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR products of *Clostridium perfringens*. Lane M – O'Gene Ruler 100 bp DNA marker (Fermentas), lanes 1, 2, 3, 4, 5 and 6 – *C. perfringens* isolates type A; lanes 7 – negative control, lanes 8 – positive control

PODSUMOWANIE

Leczenie zgorzeli gazowej wymaga natychmiastowej interwencji chirurgicznej, polegającej na opracowaniu rany oraz parenteralnej terapii antybiotykowej (zalecane antybiotyki z grupy β -laktamowych) oraz leczeniu tlenem hiperbarycznym (4). Istnieje opinia, że po każdym głębszym zranieniu należy profilaktycznie podać antybiotyki. W opisywanym przypadku, wątpliwym wydaje się fakt, żeby *Clostridium perfringens* był pierwotnym czynnikiem zakażenia. Przebieg historii choroby wskazuje na wtórne zakażenie tym drobnoustrojem, co było notowane przez innych autorów (5). Dodatkowym czynnikiem utrudniającym proces gojenia rany jest niewątpliwie cukrzyca, na którą cierpiał pacjent (6).

Określenie typu toksycznego w obrębie gatunku *Clostridium perfringens* z zastosowaniem surowic diagnostycznych daje często wyniki fałszywie ujemne, czego powodem może być zmienna ekspresja genów kodujących toksyny w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Sytuację tę utrudnia fakt, że drobnoustrój produkuje enterotoksynę odpowiedzialną za zatrucia pokarmowe (w ilości pozwalającej na wykrycie) w trakcie sporulacji, do której wymaga specyficznych warunków, co z kolei poddaje w wątpliwość stosowanie próby biologicznej w celu określenia chorobotwórczości *Clostridium perfringens*. Metody biologii molekularnej pozwalają na stwierdzenie obecności genów kodujących poszczególne toksyny przez badany szczep *Clostridium perfringens*. Zastosowana metoda umożliwia jednoczesną amplifikację potencjalnie obecnych genów kodujących toksyny główne (alfa, beta1, beta2, epsilon, iota) i enterotoksynę w trakcie jednej reakcji, co znacząco skraca czas identyfikacji poszczególnych typów toksycznych *Clostridium perfringens*. Jednocześnie metoda ta jest wiarygodna i czuła, co sprawia że może być stosowana do rutynowej diagnostyki przypadków, gdzie *C. perfringens* jest brany pod uwagę wśród czynników etiologicznych.

E Wojdat, K Kwiatek, H Zdrojewski, L Krupa

GAS GANGRENE – CASE DIAGNOSIS

SUMMARY

Anaerobic spore-forming bacteria from species *Clostridium perfringens* is commonly present in soil and in the intestines of men and animals. *Clostridium perfringens* type A are responsible for gas gangrene men and animals.

This paper describes gas gangrene case after limb amputation at 69-year-old man, treated for diabetes since several years. Used multiplex PCR generated amplification product 900 bp size (*cpa*) responsible for coding alpha toxin (CPA) present at *Clostridium perfringens* type A.

PIŚMIENNICTWO

1. Augustynowicz E. Molekularne podstawy patogennego działania *Clostridium perfringens*. Post Mikrobiol 1999;3:257-275.
2. Lorea P, Beaten Y, Chahidi N, i in. A severe complication of muscle transfer: clostridial myonecrosis. Annales de chirurgie plastique esthétique 2004; 49:32-35.

3. Baums C G. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol 2004;100:11-16.
4. Fielden P M, Martinovic E, Ells A L. Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of orbital gas gangrene. J American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus 2002;6:252-254.
5. Finkelstein B, Kamble R, Ferdinando E, i in. Autoamputation of the foot caused by untreated gas gangrene: A case report. J Foot & Ankle Surgery 2003;6:366-370.
6. Gliemroth J, Heise S, Missler U. A 69-year-old man with diabetes and ascending paraplegia. Lancet 1996;374:516.

Otrzymano: 23.06.2005 r.

Adres autorów:

lek. wet. Elżbieta Wojdat
Zakład Higieny Środków Żywnienia Zwierząt,
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
tel. (81) 886-30-51
e-mail: elawoj@piwet.pulawy.pl