

кодоне обнаружено не было, уровень детектируемого сигнала не превышал LOB. Совпадение с результатами секвенирования методом Сэнгера составило 100%.

Заключение. Разработанная система генетического исследования позволяет однозначно определять нуклеотидную последовательность 12–16-го кодона гена KRAS и, таким образом, идентифицировать все возможные варианты мутаций в 12, 13 и 15 кодонах гена KRAS. В каждом эксперименте следует тестировать контрольный образец, не содержащий мутаций в гене KRAS. Пробы с низкой концентрацией ДНК целесообразно тестировать в трех повторах. Если уровень сигнала образца ниже LOD, но выше значения LOB, пробу необходимо анализировать повторно.

Определены аналитические характеристики разработанной системы для детекции мутаций в гене KRAS для разных мутаций в анализируемых локусах на клонированных контролях. Предел детекции для мутаций G34T, G35A и G38A составил 3%. При апробации системы на клинических образцах созданный алгоритм проведения анализа и интерпретации результатов позволил идентифицировать все варианты наблюдаемых мутаций в количественном формате. Совпадение с результатами секвенирования по Сэнгеру составило 100%.

Авторы выражают благодарность проф. А.Е. Платонову за помощь в статистической обработке результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шинюлин Г.А. // Современные медицинские технологии. 2011; 6: 39–41.
2. Armbruster D.A., Pry T. // Clin. Biochem. Rev. 2008; 29. Suppl (i): 49–52.
3. Clinical and laboratory standards institute: Document EP 17: Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation // CLSI Approved Guideline. Wayne, PA USA. 2004.
4. Gao J., Li Y.-Y., Sun P.-N., Shen L. // World J. Gastroenterol. 2010; 16(38): 4858–64.
5. Linardou H., Dahabreh I.J., Kanakoulou D. et al. // Lancet Oncol. 2008; 9(10): 962–72.
6. Riely G.J., Marks J., Pao W. // Proc. Am. Thorac. Soc. 2009; 6(2): 201–5.
7. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. // Science. 1998; 281(5375): 363–5.
8. Sambrook J., Russell D. // New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. Tsiatis A.C., Norris-Kirby A., Rich R.G. et al. // J. of Mol. Diag. 2010; 12(4): 425–32.
10. Vaughn C.P., Zobel S.D., Furtado L.V. et al. // Genes Chromosomes Cancer. 2011; 50(5): 307–12.

Поступила 25.06.12

ЗАМЕТКИ ИЗ ПРАКТИКИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.98:579.852.13]-06:616-002.36-02:617-001]-078

Ю.А. Жевлакова, О.И. Хохлова, В.М. Семенихина, И.М. Устьянцева

ДИАГНОСТИКА АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, У ПАЦИЕНТА С ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ ФЛЕГМОНОЙ (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)

Федеральное государственное бюджетное лечебно-профилактическое учреждение Научно-клинический центр охраны здоровья шахтеров, г. Ленинск-Кузнецкий

Представлено редкое клиническое наблюдение анаэробной газообразующей инфекции, вызванной Clostridium perfringens. Заболевание закончилось летальным исходом на 4-е сутки после поступления.

Для успешного лечения важна своевременная диагностика клостридиальной инфекции, основанная на комплексе микробиологических, клинических и лабораторных данных. Ранняя диагностика возможна при бактериологическом исследовании нативного материала.

Ключевые слова: анаэробная инфекция, газовая гангрена, бактериологическое исследование

Yu.A. Jevlakova, O.I. Khokhlova, V.M. Semikhina, I.M. Ustiyantseva

THE DIAGNOSTIC OF ANAEROBIC INFECTION INDUCED BY CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN PATIENT WITH POST-TRAUMATIC PHLEGMON: A CLINICAL CASE

The research clinical center of miners' health, Leninsk-Kuznetskiy, Russia

The article presents uncommon clinical case of anaerobic gas-producing infection induced by Clostridium perfringens. The disease resulted in lethal outcome at fourth day after admission of patient into hospital. The successful treatment requires timely diagnostic of clostridium infection based on complex of microbiologic, clinical and laboratory data. The early diagnostic is possible in case of bacteriologic analysis of native material.

Key words: anaerobic infection, gas gangrene, bacteriologic analysis

Для корреспонденции:

Устьянцева Ирина Марковна, д-р биол. наук, проф.
Адрес: 652509, Кемеровская обл., Ленинск-Кузнецкий, 7-й микр-н, 9
Телефон: 8(38456) 2-38-88
E-mail: irmaust@gnks.kuzbass.net

Раневая анаэробная клостридиальная (газовая) инфекция – острое, тяжелое инфекционное осложнение, которое вызывается инвазией в рану и размножением в ней клостридий. Возбудителями анаэробной инфекции считаются: Clostridium perfringens, C. oedematiens, C. septicum (основная причина спонтанных нетравматических газовых гангренов), C.

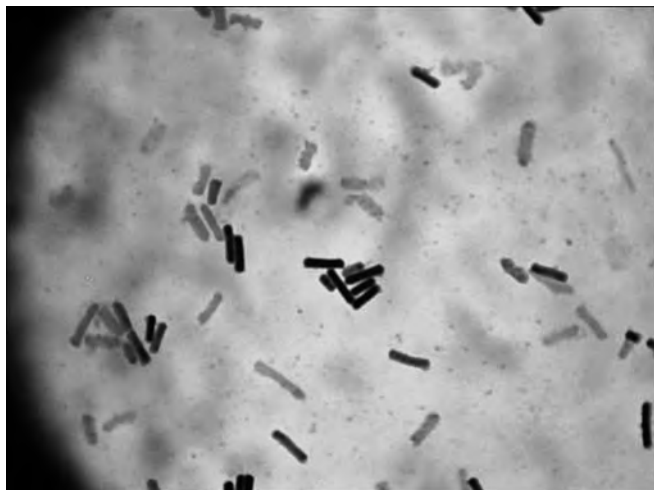


Рис. 1. Бактериоскопия первичного материала (ув. 1000).

histoliticum. Совокупность этих бактерий называют грозной четверкой [4].

Газовая гангрена наиболее часто возникает во время военных действий и поражает от 0,08 до 1,5% раненых [2]. Инфицирование ран клостридиями является обязательным, но не основным фактором развития анаэробной инфекции. Описаны случаи выявления анаэробов в 60–90% ран, однако клостридиальная гангрена возникла лишь у 1–2% пострадавших [3]. В мирное время в гражданской хирургии это раневое осложнение возникает не только при ранениях и травмах, но и при хирургических операциях и инъекциях. Предпосылками к развитию анаэробной инфекции могут стать травматизация раны при транспортировке, нарушение общего и местного кровообращения, снижение защитных сил организма (голодание, переутомление, переохлаждение) [1].

Недостаточная осведомленность, забывчивость, и незнание этого рода раневого осложнения приводят к грубейшим, роковым ошибкам – запоздалой диагностике, а следовательно, несвоевременному комплексному лечению, главным компонентом которого является оперативное вмешательство. Исключительная важность ранней диагностики раневой анаэробной клостридиальной инфекции заключается в том, чтобы не допустить развития патологического процесса до такой степени, при которой диагноз гангрены конечности становится очевидным, прогноз осложнения сомнительным, а действия хирурга малоэффективными [1].

Материалы и методы. Пациент Б., 27 лет, доставлен в приемное отделение ФГБЛПУ НКЦОЗШ 17.10.11 в 22 ч, через 48 ч с момента травмы (предположительно, был избит) с диагнозом: флегмона латеральной поверхности брюшной стенки слева. Алкогольная интоксикация тяжелой степени. Закрытый перелом VIII ребра слева.

Через 1 ч 15 мин после поступления больному выполнено вскрытие флегмоны. При ревизии раны определялся некроз подкожной жировой клетчатки передней брюшной стенки в нижних отделах боковой стенки живота слева, грудной клетки слева; выявлен некроз мягких тканей мошонки слева. Выполнена некрэктомия.

Состояние пациента после операции оставалось тяжелым. Тяжесть обусловлена полиорганной дисфункцией (почечно-печеночной, дыхательной, церебральной) вследствие синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), водно-электролитных и кислотно-основных нарушений. Через 48 ч после операции – повышение температуры до 39°C, сознание угнетено до комы (по шкале ком Глазго 8 баллов). Пульс на лучевых артериях ослаблен. По данным рентгенологического



Рис. 2. Рост культуры из нативного материала через 2 сут после посева в среду обогащения.

исследования – подкожная эмфизема передней и латеральной поверхности брюшной стенки слева. По характерной клинической картине заподозрена анаэробная инфекция.

В связи с нарастающей интоксикацией по жизненным показаниям выполнена некрэктомия. При ревизии мышц передней стенки живота и грудной клетки обнаружено, что мышечная ткань тусклая, дегенеративно изменена, некроточащая. Взят материал для микроскопического и культурального исследования на анаэробные возбудители инфекции из раны до оперативного вмешательства, а также во время операции.

Всего перед операцией и во время нее взято и бактериологически исследовано 6 образцов тканей. В послеоперационном периоде также исследовали 6 флаконов питательных сред с образцами крови.

Взятие проб для бактериологического исследования, ход исследования и интерпретацию результатов проводили согласно действующим нормативным документам и рекомендациям [5, 6]. Посев на плотные питательные среды для



Рис. 3. Рост культуры из нативного материала через 2 сут на 5% кровяной агар.

культивирования анаэробов с использованием специальных пакетов и генераторов анаэробной среды ("Bio Merieux", Франция) осуществляли модифицированным методом J. Gould [7].

Идентификация микроорганизмов проводилась на бактериологическом анализаторе iEMS Reader MF ("Labsystems", Финляндия) с помощью мультимикротестов "La Chema" (Чехия). Микроскопическое исследование окрашенных по Граму мазков-отпечатков кусочков ткани проводили при увеличении $\times 1000$.

Результаты и обсуждение. При микроскопии мазков-отпечатков из пограничных со здоровыми тканями раны передней брюшной стенки, грудной клетки слева выявлены грамотрицательные палочки в количестве до 10–20 в поле зрения, предположительно, кишечные палочки. Обнаружены короткие толстые грамположительные палочки с обрубленными концами (8–10 в поле зрения), морфологически сходные с *Clostridium perfringens* (рис. 1).

Культуральное исследование материалов подтвердило результаты бактериоскопии: выделены *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens* в количестве 10^5 КОЕ/г (рис. 2, 3).

С 1-х суток после поступления пострадавшему внутривенно вводили цефтриаксон по 2 г 3 раза в сутки и метронидазол по 0,5 г 2 раза в сутки.

Несмотря на антибиотикотерапию и проведенное оперативное вмешательство интоксикация нарастала (по данным лабораторного исследования: лейкоцитоз $16,3 \cdot 10^9$ /л со сдвигом лейкоцитарной формулы влево до незрелых гранулоцитов, Hb 65 г/л, тромбоциты $44 \cdot 10^9$ /л, СОЭ 51 мм/ч, фибриноген 6,34 г/л, содержание среднемолекулярных пептидов 1,173 усл.ед). Смерть больного наступила на 4-е сутки после поступления в отделение реанимации.

При аутопсии обнаружены кровоизлияния в мягкие ткани груди, живота, кровоподтеки на задней поверхности груди по лопаточной линии на уровне VI ребра. Непосредственной причиной смерти больного явилась полиорганная недостаточность, обусловленная анаэробной инфекцией.

Отсутствие осторожности в отношении возможности развития анаэробной инфекции не позволило провести своевременную диагностику и адекватную терапию, что привело к смерти больного.

Бактериоскопическое исследование нативного материала – метод выбора экспресс-диагностики анаэробной инфекции, позволяющий получить быстрый ориентировочный ответ о ведущем возбудителе гангрены и своевременно начать оптимальное лечение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богомолов Б.П., Ткачева И.В., Митюшина С.А. и др. Анаэробная газообразующая клостридиальная эндогенная инфекция у больного сальмонеллезом. Клиническая медицина 2008; 5: 66–9.
2. Кузина М.И., Костюченко Б.М. Раны и раневая инфекция. М.: Медицина; 1981.
3. Меньшиков Е.Д., Титова Г.П., Картавенко В.И. и др. Микробиологическая диагностика случая газовой гангрены, вызванной *Clostridium septicum*. Клиническая лабораторная диагностика. 2010; 8: 53–5.
4. Мохов Е.М., Гостищев В.К., Ковалев А.И. Анаэробная инфекция. Пропедевтика хирургии: Избранные лекции. М.: Медицина 2007.
5. Приказ Минздрава СССР № 535 от 22 апреля 1985 г. "Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений". М.: Медицина; 1985.
6. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г., Резван С.П., Карп В.П. Практические аспекты современной клинической микробиологии. М.: Медицина; 1997.
7. Gould J.C. Quantity and quality in the diagnosis of urinary tract infections. Br. J. Urol. 1965; 37(1): 7–12.

Поступила 26.10.12

Редакционный комментарий

Как вполне справедливо отмечают авторы статьи, для успешного лечения анаэробной газовой гангрены необходима своевременная диагностика. Поскольку клиническая картина при анаэробной газовой гангрене очень быстро нарастает (отек, некроз пораженных тканей, интоксикация), важное значение в постановке этиологического диагноза приобретают методы микробиологической диагностики.

Бактериологическое исследование на анаэробы длительно, трудоемко и дорого. Время, затрачиваемое с момента доставки анализа в микробиологическую лабораторию до получения полного развернутого ответа, составляет от 7 до 10 сут, что абсолютно не удовлетворяет требованиям клиницистов. Особенно остро эта проблема стоит в неотложной хирургии. Эффективное лечение гнойно-воспалительных заболеваний требует быстрой индикации патогена и его идентификации как аэроба или анаэроба; эти данные необходимы для выбора адекватной антибактериальной терапии и решения вопроса о способе и объеме хирургического вмешательства. Ответ из бактериологической лаборатории обычно приходит к моменту выписки больного или же, когда потребность в нем уже отпадает, как в описанном случае. Поэтому для клинициста гораздо важнее иметь ориентировочный ответ о наличии или отсутствии анаэробов в анализе в день поступления больного в стационар, чем полный развернутый ответ на 7–10-е сутки. В этой связи особую актуальность приобретают методы экспресс-диагностики.

К числу экспресс-методов диагностики анаэробной клостридиальной инфекции относятся физико-химические методы анализа химического состава микробной клетки и продуктов ее метаболизма. Одним из таких методов является газовая хроматография. Использование газовой хроматографии с целью экспресс-диагностики анаэробной неклостридиальной инфекции основано на индикации в анализе специфических продуктов метаболизма анаэробных бактерий – летучих жирных кислот, которые служат молекулярными маркерами наличия анаэробов в анализе.

Высокоспецифичными конечными продуктами метаболизма углеводов у анаэробов являются жирные кислоты – короткоцепочечные (КЖК) или летучие (ЛЖК) с длиной углеродной цепи – C_2 – C_7 , и длинноцепочечные – нелетучие кислоты. Индикация в анализе жирных кислот методом газовой хроматографии является убедительным доказательством анаэробной этиологии заболевания. Методом газовой хроматографии технически более просто определять ЛЖК. Молекулярными маркерами анаэробов являются изомасляная и масляная, изовалериановая и валериановая, изокапроновая и капроновая, гексановая и каприловая кислоты.

Методика подготовки пробы к газохроматографическому анализу и ее последующий анализ просты, хорошо воспроизводимы и занимают 30–50 мин от момента доставки анализа в лабораторию до получения ответа. Ответ может быть получен в ходе проведения хирургической операции.

Используя газовую хроматографию можно проводить послыное интраоперационное хроматографическое исследование тканей с определением содержания в них ЛЖК, токсических метаболитов. Исследуются различные уровни пораженных анаэробной клостридиальной инфекцией тканей: кожа, подкожная клетчатка, фасции, мышцы, фрагменты сосудисто-нервного пучка, фрагменты костей. Получив данные послыного хроматографического исследования и убедившись в наличии анаэробного целлюлита, фасциита, миозина или одновременного смешанного поражения всех указанных тканей, хирург производит полное удаление патологически измененных кожи, подкожной жировой клетчатки, фасций, мышц. Исследования целесообразно дополнить динамическим хроматографическим анализом ЛЖК и токсических метаболитов в зоне поражения анаэробной инфекцией. Возможность интраоперационного газохроматографического исследования мягких тканей позволяет оперативно проводить коррекцию тактики оперативного вмешательства и существенно снизить необходимость повторных некрэтомий.

Мы рекомендуем читателям обратить внимание на диагностические возможности метода газовой хроматографии. Подробную информацию по данной проблеме можно найти в статье Миронова А.Ю. Современные подходы к лабораторной диагностике анаэробной неклостридиальной инфекции (лекция). Клиническая лабораторная диагностика. 2011; 8: 25–35.

Член редакционной коллегии журнала
проф. А.Ю. М и р о н о в