

Инфекционный эндокардит: этиология и роль современных методов в микробиологической диагностике

Е.О. Котова¹, А.С. Писарюк^{1,2}, Э.А. Домонова³, Ю.Л. Караулова^{1,2},
О.Ю. Сильвейстрова³, О.Ю. Шипулина³, Г.А. Шипулин³, В.С. Моисеев¹

¹Кафедра факультетской терапии РУДН, ²ГБУЗ "Городская клиническая больница №64 ДЗМ"

³Отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Цель. Изучить этиологию инфекционного эндокардита (ИЭ) на протяжении 5 лет по данным скорпомощной больницы и определить значение молекулярно-биологических методов диагностики.

Материал и методы. В исследование включили 125 больных с достоверным или вероятным ИЭ (критерии Duke, 2009), госпитализированных в 2010-2015 гг. (медиана возраста 50 лет, 77 мужчин, первичная форма ИЭ — у 70). У 61 (48,8%) пациента проведено молекулярно-биологическое исследование крови (ПЦР или ПЦР с последующим секвенированием) на широкий спектр возбудителей.

Результаты. Результаты посевов крови были положительными у 73 (58,4%) обследованных: *Staphylococcus* spp. (n=42, 57,5%), *Enterococcus* spp. (n=9, 12,3%), не НАСЕК группа (n=4, 5,5%) и *Streptococcus* spp. (n=3, 4,1%). Положительные результаты бактериологического метода были получены у 30 (49,2%) из 61 пациента, которому проводили молекулярно-биологическое исследование, ПЦР — у 42 (68,9%) больных, в том числе у 16 пациентов с культуронегативным ИЭ. У 7 (11,5%) пациентов результаты двух методов отличались: в трех случаях выявлены разные возбудители (при бактериологическом исследовании рост *Enterococcus* spp., при ПЦР — ДНК *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*), а у четырех имела место ложноотрицательная ПЦР.

Заключение. Этиология современного ИЭ преимущественно представлена стафилококковой и энтерококковой флорой, стрептококковый ИЭ встречается редко. Применение ПЦР позволяет увеличить частоту выявления этиологического фактора ИЭ.

Ключевые слова. Инфекционный эндокардит, бактериологические методы диагностики, полимеразная цепная реакция, молекулярно-биологические методы, *Staphylococcus aureus*.

Клин. фармакол. тер., 2016, 25 (3), 28-31.

Инфекционный эндокардит (ИЭ) относится к наиболее опасным для жизни заболеваниям, с трудом поддается лечению и характеризуется постоянно меняющейся клинической картиной. Для диагностики ИЭ в настоящее время применяют моди-

фицированные критерии Duke, обновленные в 2015 г., которые позволяют стандартизировать постановку диагноза и определить алгоритм дальнейшего поиска [1-3]. К "большим" критериям относятся вегетации на внутрисердечных структурах и положительная гемокультура, определяющая выбор эффективной антибактериальной терапии. К сожалению, установить этиологический фактор удается не всегда. Так, в странах Европы культуронегативный ИЭ встречается у 2,5-31% больных [1,3], в Африке — у 40-69,7% [4,5], а в России — у 31,7-87% [6,7]. Причины отрицательного результата бактериологического исследования крови включают проведение антибиотикотерапии до взятия крови на стерильность, нарушение правил забора крови (несоблюдение интервалов времени, недостаточное количество образцов), ИЭ правых отделов сердца, ИЭ при тяжелой почечной патологии (с уремией), ИЭ протезированного клапана и внутрисердечных устройств, инфицирование редкими микроорганизмами (*Bartonella* spp., *Brucella* spp., *Legionella* spp., *Chlamydia* spp., *Coxiella burnetii* и *Tropheryma whippelii*) [1,8,9]. Для усовершенствования идентификации возбудителя при ИЭ, особенно при культуронегативном ИЭ, предлагается применение иммунохимических (реакция непрямой иммунофлюоресценции или иммуноферментный анализ) и молекулярно-биологических методов (полимеразная цепная реакция [ПЦР], реакция циклического секвенирования), что нашло отражение в рекомендациях Европейского общества кардиологов 2015 года, в которых, по сравнению с аналогичным документом 2009 года, были значительно расширены показания для ПЦР [1,2,9-11].

Возможность применения молекулярных методов для диагностики ИЭ обсуждается на протяжении 20 лет, однако до настоящего времени, несмотря на расширение показаний, ПЦР не внесена в основные критерии ИЭ, что связано с длительным сохранением ДНК/РНК в крови/тканях клапана после перенесенного ИЭ, возможностью ложноотрицательных результатов ПЦР [4,12-18], а также трудностями интерпретации данных ПЦР в связи с необходимостью выделения из широко спектра выявленных возбудителей только этиологически значимых организмов [19,20]. Крупномасштабные

Адрес: 117292, г. Москва, ул. Вавилова, д. 61, ГКБ №64

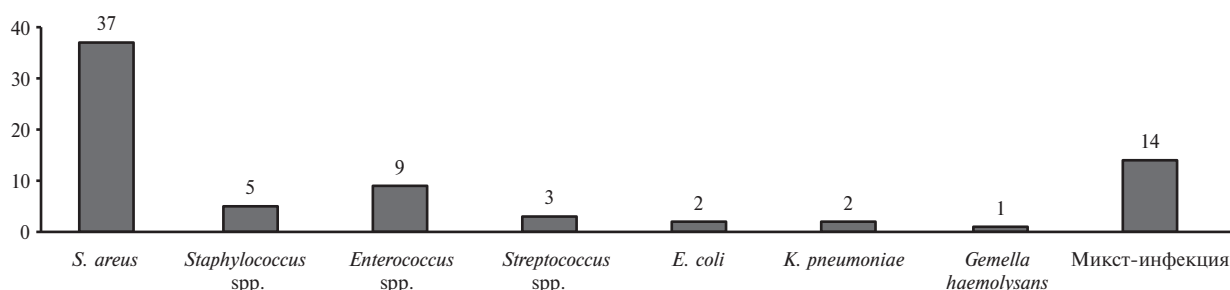


Рис. 1. Этиология ИЭ у 73 больных с положительными результатами посева крови

исследования по определению особенностей идентификации возбудителей методом ПЦР в крови при ИЭ практически отсутствуют.

Целью исследования было изучение этиологии ИЭ за последние 5 лет и возможностей молекулярно-биологических методов исследования в диагностике ИЭ.

Материал и методы

В исследовании были включены 125 больных ИЭ, находившихся на лечении в Городской клинической больнице №64 с января 2010 г. по январь 2015 г. Архивная часть исследования предполагала анализ истории болезней 64 (51,2%) пациентов, проспективная – обследование 61 (48,8%) больного. Диагноз ИЭ устанавливали на основании модифицированных критериев Duke 2009 года.

Всем пациентам проводили культуральный посев крови, а в проспективной части (n=61) – молекулярно-биологическое (ПЦР или ПЦР с последующим секвенированием) исследование. Кровь брали в стерильных условиях до назначения антибиотикотерапии (по 20 мл три раза с интервалом 20-30 минут из трех разных периферических вен). Кровь распределяли (по 10 мл) во флаконы с питательными средами “VersaTREK REDOX1” (аэробная среда) и “REDOX2” (анаэробная среда) и инкубировали в автоматическом бактериологическом анализаторе “VersaTREK 528 Galen” (Россия) в течение 5 дней. Положительную культуру высевали на дифференциально-диагностические среды с последующей идентификацией возбудителя по общепринятой методике и определением антибиотикоустойчивости. Средняя продолжительность выполнения бактериологического исследования составляла 5-7 дней.

У 61 пациента трижды брали по 5 мл крови в стерильные пробирки с ЭДТА, которые доставляли в течение 24 ч в отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (зав. отделом – к.м.н. Г.А. Шипулин). Спектр возбудителей, определяемых при помощи молекулярно-биологического метода, включал в себя следующие бактерии и грибы: ДНК метициллинчувствительного и метициллинрезистентного *S. aureus*, метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp., ДНК энтеробактерий (семейства *Enterobacteriaceae*, включая *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. и др.), *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., ДНК *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, ДНК *S. agalactiae*, ДНК *S. pyogenes*, ДНК грибов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*), ДНК энтерококков (включая *E. faecium*, *E. faecalis* и др.). Средняя продолжительность выполнения ПЦР составляла 4-6 ч, ПЦР с секвенированием – 1-2 дня.

Математическую и статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов прикладного про-

граммного обеспечения Statistica for Windows 6.0 и Excel 7.0 (Microsoft, США), Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Результаты

Среди 125 больных ИЭ, включенных в исследование (медиана возраста 50 [33-72] лет) было 77 (61,6%) мужчин и 48 (38,4%) женщин. Достоверный диагноз ИЭ был установлен у 104 (83,2%) пациентов, вероятный – у 21 (16,8%). Первичная форма ИЭ имела у 70 (56,0%) пациентов, вторичная – у 55 (44,0%). Последняя была представлена неревматическими поражениями клапанов сердца (n=27, 21,6%), ревматическими пороками (n=4, 3,2%), ИЭ на фоне перенесенного ранее ИЭ (n=6, 4,8%), ИЭ протеза клапана (n=16, 12,8%) и ИЭ кардиостимулятора (n=2, 1,6%). Преобладало поражение одного клапана (n=110, 88,0%) с локализацией вегетаций на аортальном клапане (n=47, 37,6%), несколько реже встречался ИЭ трикуспидального (n=34, 27,2%) и митрального (n=29, 23,2%) клапанов. Многоклапанная локализация вегетаций имела у 15 (12,0%) обследованных. Употребление внутривенных наркотиков было выявлено у 45 (36%) пациентов, алкоголя – у 33 (26,4%). Из сопутствующих заболеваний наиболее часто встречалась артериальная гипертония (n=63, 54%), реже – фибрилляция предсердий (n=28, 22,4%), ишемическая болезнь сердца (n=25, 20%), церебральные заболевания (n=23, 18,4%), сахарный диабет (n=18, 14,4%), цирроз печени (n=9, 7,2%). Благоприятный исход наблюдался у большинства обследованных (n=72, 56,6%), протезирование клапана выполнено 13 (10,4%) пациентам, умерли 32 (25,6%) больных.

Результаты посева крови были положительными у 73 (58,4%) из 125 больных (рис. 1). Наиболее частыми возбудителями были представители *Staphylococcus* spp. (n=42, 57,5%), прежде всего *Staphylococcus aureus* (n=37, 50,7%). Несколько реже встречались *Enterococcus* spp. (n=9, 12,3%), грамотрицательные бактерии не НАСЕК группы (n=4, 5,5%), в том числе *Escherichia coli* (n=2, 2,7%) и *Klebsiella pneumoniae* (n=2, 2,7%), и крайне редко – *Streptococcus* spp. (n=3, 4,1%). Грибковая этиология ИЭ (*Candida albicans*) выявлена только в одном случае в составе полифлоры, микст-инфекция – у 14 (19,2%) обследованных.

В проспективной части исследования 61 больному дополнительно было проведено молекулярно-биологи-

ТАБЛИЦА 1. Несовпавшие результаты бактериологического и ПЦР исследования венозной крови (n=23)

| Результаты бактериологического исследования | Результаты молекулярно-биологического исследования |
|--|--|
| <i>E. faecalis</i> (1) | MRCoNS, <i>Streptococcus</i> spp. |
| <i>E. faecium</i> (1) | <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus</i> spp. |
| <i>E. columbae</i> (1) | <i>S. gallolyticus</i> |
| MSSA (3) | ПЦР отрицательная (3) |
| <i>E. faecium</i> , <i>K. pneumoniae</i> (1) | ПЦР отрицательная (1) |
| Отрицательная культура крови (16) | MSSA (7) MRCoNS: <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> (2), <i>Aspergillus</i> spp. (1), <i>P. multocida</i> (1), <i>S. agalactiae</i> (1), <i>Enterococcus</i> spp. (1), <i>S. constellatus</i> (1), <i>C. albicans</i> , <i>S. epidermidis</i> (1) <i>Staphylococcus</i> spp., <i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> (1) |

Примечание: MSSA - метициллинчувствительный *S. aureus*, MRCoNS - метициллинрезистентные коагулазонегативные стафилококки

ческое исследование крови. Среди пациентов с положительной культурой крови (n=30, 49,2%) ДНК возбудителя выявлена у 26 обследованных, при этом в 3 случаях результаты двух методов расходились. Среди пациентов с отрицательными результатами бактериологического исследования крови (n=31, 50,8%) ДНК возбудителя была выявлена методом ПЦР у 16 (26,2%) больных (табл. 1).

Обсуждение

Установление этиологии ИЭ имеет решающее значение для выбора оптимальной антибактериальной терапии. В нашем исследовании гемокультура была положительной у 73 (58,4%) обследованных и представлена преимущественно *Staphylococcus aureus*, значительно реже – *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp. Увеличение доли стафилококка и уменьшение доли стрептококка в этиологии ИЭ согласуются с мировыми трендами [4,21,22], хотя в некоторых странах стрептококки остаются основными возбудителями ИЭ. Например, в Японии их доля достигала 58,0% среди всех положительных культур крови [23].

Культуронегативный ИЭ нами был диагностирован у 41,6% обследованных. Этот показатель соответствует таковому в Египете (69,7%), Сенегале (69,0%), Алжире (61,0%), Англии (59,5%), Саудовской Аравии (45,5%), но значительно выше, чем во Франции (9,0%), Швеции (10,0%) и Дании (28,0%) [5,21-26]. В России данный факт можно объяснить бесконтрольным приемом антибактериальных препаратов на догоспитальном этапе, поздним обращением пациентов за помощью и поздним выявлением ИЭ, что приводит к снижению вероятности бактериемии и низкой концентрации возбудителя в крови. В южных странах важное значение имеет также высокая частота зоонозных инфекций (*Brucella* spp.) и трудно культивируемых (*Bartonella* spp.

и *Coxiella* spp.) возбудителей. *Tropheryma whippelii* как этиологический агент ИЭ относится к крайне редким возбудителям [27]. В проведенном исследовании нам не удалось выявить ни одного представителя зоонозных или трудно культивируемых возбудителей.

Полное совпадение результатов посева крови и ПЦР методов отмечено у 38 (62,3%) пациентов, разные возбудители – у 3 (4,9%), ложноотрицательная ПЦР – у 4 (6,6%), а положительный результат ПЦР при культуронегативном ИЭ – у 16 (26,2%). Случаи несовпадения возбудителей, выявленных с помощью традиционного бактериологического и молекулярно-биологического методов, могли быть связаны с возможной неточностью идентификации микроорганизма фенотипическими методами [28]. Отрицательные результаты ПЦР при наличии кокковых возбудителей в гемокультуре С. Ламас и соавт., получившие аналогичные результаты, объяснили техническими особенностями, связанными с трудностью разрушения клеточной стенки в процессе экстракции ДНК [5]. Не представляется также возможным полностью исключить контаминацию культуры крови при использовании традиционных бактериологических методов диагностики при отсутствии возможности изучения тканей пораженных клапанов [5,14,28]. Наибольшую ценность представляет установление этиологии культуронегативного ИЭ, на долю которого по зарубежным данным приходится до 31-60% случаев заболевания [2,28], а в России – до 31,7-87% [6,7]. Нам удалось прижизненно установить возбудителя у 16 (51,6%) из 31 пациента с отрицательной гемокультурой, что позволило назначить соответствующую антибактериальную терапию.

Таким образом, в последние 5 лет в структуре этиологии ИЭ преобладают стафилококки, преимущественно *S. aureus*, и энтерококки, в то время как доля стрептококкового эндокардита значительно уменьшилась, что определяет неблагоприятное течение болезни и сохранение высокой летальности. Своевременная этиологическая диагностика позволяет назначить адекватную антибактериальную терапию и улучшить результаты лечения, однако обращает на себя внимание высокая частота культуронегативного ИЭ. Молекулярно-биологическое исследование вносит существенный вклад в улучшение этиологической диагностики ИЭ, прежде всего при отрицательных результатах посевов крови, а также в качестве контрольного метода. Однако необходимо дальнейшее изучение молекулярно-биологического метода в крупных исследованиях.

- Habib G. et al. ESC Guidelines for the management of infective endocarditis. Eur Heart J 2015;DOI 10.1093/eurheartj/ehv319.
- Habib G, Hoen B, Tornos P. et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009). Eur Heart J 2009;30:2369-413.
- Karchmer AW. Infective endocarditis. In: Braunwald's Heart Disease, 2015:1540-59.
- El-Kholy AA1, El-Rachidi NG1, El-Enany MG et al. Impact of serology and molecular methods on improving the microbiologic diagnosis of infective endocarditis in Egypt. Infection 2015;43(5):523-9.
- Lamas C, Fournier PE, Zappa M, et al. Diagnosis of blood culture negative endocarditis and clinical comparison between blood culture negative and blood culture positive cases. Infection 2015 Dec 15. [Epub ahead of print].
- Тюрин В.П. Инфекционные эндокардиты, руководство. Под ред. акад. РАМН Шевченко Ю.Л. М.: Геотар-Медиа, 2012:233-46.

7. Моисеев В.С., Котова Е.О., Караулова Ю.Л. Эпидемиология и клиническое течение современного инфекционного эндокардита (по данным муниципальной больницы). *Клин фармакол тер* 2014;23(3):62-6.
8. Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;47:1-13.
9. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30(1):7-15.
10. Tahir T, Sanjay K. Molecular diagnosis of infective endocarditis: A helpful addition to the Duke criteria. *Clin Med Res* 2004;2(4):206-8.
11. Millar BC, Moore JE. Current trends in the molecular diagnosis of infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:353-65.
12. Kemp M, Bangsbo J, Kjerulf A, et al. Advantages and limitations of ribosomal RNA PCR and DNA sequencing for identification of bacteria in cardiac valves of Danish patients. *Open Microbiol J* 2013;27(7):146-51.
13. Kühn C, Disqué C, Mühl H, et al. Evaluation of commercial universal rRNA gene PCR plus sequencing tests for identification of bacteria and fungi associated with infective endocarditis. *J Clin Microbiol* 2011;49(8):2919-23.
14. Röver C, Greub G, Lepidi H, et al. PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. *J Clin Microbiol* 2005;43:163-7.
15. Ahmed MS, Nistal C, Jayan R, et al. *Achromobacter xylosoxidans*, an emerging pathogen in catheter-related infection in dialysis population causing prosthetic valve endocarditis: a case report and review of literature. *Clin Nephrol* 2009;71:350-4.
16. Podglajen I, Bellery F, Poyart C, et al. Comparative molecular and microbiologic diagnosis of bacterial endocarditis. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1543-7.
17. Kalokhe AS, Rouphael N, El Chamia MF, et al. *Aspergillus* endocarditis: a review of the literature. *Internat J Inf Dis* 2010;14:e1040-7.
18. Vollmer T, Piper C, Horstkotte D, et al. 23S rDNA real-time polymerase chain reaction of heart valves: a decisive tool in the diagnosis of infective endocarditis. *Eur Heart J* 2010;31:1105-13.
19. Fournier PE, Thuny F, Richet H, et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis* 2010;51:131-40.
20. Bouscier R, Rogez S, Francois B, et al. Two-step bacterial broad-range polymerase chain reaction analysis of heart valve tissue improves bacteriological diagnosis of infective endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:240-44.
21. Ndiaye MB, Diao M, Kane A, et al. Infective endocarditis in the middle cardiac Dakar: descriptive study about 39 cases. *Pan African Medical Journal* 2010;1937:8688.
22. Assiri AS. Clinical and microbiological profiles of infective endocarditis in a tertiary hospital in Aseer region, Saudi Arabia. *J Saudi Heart Assoc* 2011;23:207-11.
23. Miyazato A, Ohkusu K, Tabata M, et al. Comparative molecular and microbiological diagnosis of 19 infective endocarditis cases in which causative microbes were identified by PCR-based DNA sequencing from the excised heart valve. *J Infect Chemother* 2012;18:318-23.
24. Voldstedlund M, Pedersen NL, Baardrup U, et al. Broad range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis. *APMIS* 2008;116:190-8.
25. Benslimani A, Fenollar F, Lepidi H, et al. Bacterial zoonoses and infective endocarditis, Algeria. *Emerg Infect Dis* 2005;11:216-24.
26. Vondracek M, Sartipy U, Aufwerber E, et al. 16S rDNA sequencing of valve tissue improves microbiological diagnosis in surgically treated patients with infective endocarditis. *J Infect* 2011;62:472-8.
27. Marsch G, Orszag P, Mashaqi B, et al. Antibiotic therapy following polymerase chain reaction diagnosis of infective endocarditis: a single centre experience. *Interact CardioVasc Thorac Surg* 2015;20:589-93.
28. Harris KA, Yam T, Jalili S, et al. Hartley Service evaluation to establish the sensitivity, specificity and additional value of broad-range 16S rDNA PCR for the diagnosis of infective endocarditis from resected endocardial material in patients from eight UK and Ireland hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:2061-6.

Infective endocarditis: etiology and role of contemporary methods in establishing the microbiological diagnosis

E.O. Kotova, A.S. Pisaryuk, E.A. Domonova, Yu.L. Karaulova, O.Yu. Sil'veistrova, O.Yu. Shipulina, G.A. Shipulin, V.S. Moiseev

Aim. To study the etiology of infective endocarditis (IE) over 5 years in general municipal hospital and to define the diagnostic significance of molecular microbiological methods.

Material and methods. We recruited 125 patients (median age 50 years, 77 male) with definite IE (DUKE 2009), hospitalized in 2010-2015 to the city clinical hospital. Etiology of IE was studied with standard method in all patients and with PCR or PCR with DNA sequencing in 61 (48.8%) patients.

Results. Primary IE was diagnosed in 70 (56%) cases. Seventy three (58.4%) patients had positive blood cultures, represented primarily by *Staphylococcus* spp. (n = 42, 57.5%), *Enterococcus* spp. (n = 9, 12.3%), non-HACEK group (n = 4, 5.5%) and *Streptococcus* spp. (n = 3, 4.1%). Molecular microbiological blood tests were performed in 61 patients; 30 (49.2%) of them had positive blood cultures, and 42 (68.9%) had positive PCR, including 16 cases of culture-negative IE. The results of two methods were discordant in 7 (11.5%) patients: different infectious agents were detected in 3 cases (*Enterococcus* spp. in blood cultures, with *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli* DNA diagnosed by PCR), and 4 patients had false-negative PCR.

Conclusion. Etiology of contemporary IE is represented mainly by staphylococcal and enterococcal bacteria, while streptococcal IE is rare. The infectious agent could be detected in venous blood samples by traditional diagnostic method in 58.4% of patients, by PCR in 68.9% and by combination of two methods in 71.2%.

Key words. *Infective endocarditis, bacteriological diagnostic methods, polymerase chain reaction, molecular microbiological methods, Staphylococcus aureus.*

Clin. Pharmacol. Ther., 2016, 25 (2), 28-31.