

Małgorzata MAŁEK-ELIKOWSKA¹
 Waldemar ELIKOWSKI²
 Monika LISIECKA³
 Andrzej SZYSZKA¹

Diagnostyka mikrobiologiczna infekcyjnego zapalenia wsierdza w świetle nowych wytycznych Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego ze szczególnym uwzględnieniem metod molekularnych

Microbiological diagnostics of infective endocarditis in the light of the new guidelines of the European Society of Cardiology with particular focus on the molecular methods

¹II Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
 Kierownik:
 Prof. dr hab. med. *Andrzej Szyszka*

²Oddział Chorób Wewnętrznych, Szpital im. J. Strusia w Poznaniu
 Kierownik:
 Prof. dr hab. med. *Piotr Psuja*

³Pracownia Bakteriologiczna, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Szpital im. J. Strusia w Poznaniu
 Kierownik:
 Mgr farm. *Danuta Kawczyńska*

Dodatkowe słowa kluczowe:
 infekcyjne zapalenie wsierdza
 diagnostyka mikrobiologiczna
 metody molekularne
 spektrometria masowa
 reakcja łańcuchowej polimerazy

Additional key words:
 infective endocarditis
 microbiologic diagnostics
 molecular methods
 mass spectrometry
 polymerase chain reaction

W pracy omówiono aktualne możliwości konwencjonalnej i molekularnej diagnostyki mikrobiologicznej infekcyjnego zapalenia wsierdza (IE). Diagnostyka konwencjonalna wykorzystuje automatyczne systemy do inkubacji i detekcji biochemicznej drobnoustrojów. Metody molekularne oparte są na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz spektrometrii masowej z desorpcją/ jonizacją laserową wspomaganą matrycą i z analizą czasu przelotu (MALDI-TOF MS). MALDI-TOF MS po raz pierwszy uwzględniono w nowych wytycznych postępowania w IE opublikowanych przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC) w 2015 r. Największą zaletą tej metody jest krótki czas, po którym uzyskuje się identyfikację patogenu. Główne jej wady to konieczność wyhodowania drobnoustroju z krwi i brak oceny lekowności. Autorzy nie znaleźli w polskim piśmiennictwie doniesienia o wykorzystaniu MALDI-TOF MS do identyfikacji patogenów przy podejrzeniu IE. Wynika to zapewne ze znikomej dostępności metody w Polsce. Praca ma na celu zwrócenie uwagi na możliwości nowoczesnych technologii w diagnostyce trudnych, przebiegających z ujemnymi posiewami krwi przypadków IE. Uwzględnia również krytyczne spojrzenie na pozycję masowej spektrometrii w zaproponowanym przez ESC schemacie diagnostycznym IE.

The authors describe the present-day possibilities of routine and molecular microbiologic diagnostics of infective endocarditis (IE). Routine diagnostics employs automated microbial growth and biochemical detection systems. Molecular methods are based on polymerase chain reaction (PCR) and matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). MALDI-TOF MS first appeared in the new guidelines for the management of IE of the European Society of Cardiology published in 2015. The greatest benefit of MALDI-TOF MS is the short time of pathogen identification. The main disadvantages are the necessity of routine agar cultures and lack of antimicrobial susceptibility estimation. So far, there has been no Polish literature report on MALDI-TOF MS used for pathogen identification in suspected IE. This may well result from scarce accessibility of the method in Poland. The paper aims to stress the importance of an up-to-date technology in the diagnostics of difficult, blood culture negative cases of IE. It also takes into consideration the limitations of mass spectrometry in the ESC diagnostic scheme of IE.

Wprowadzenie

Infekcyjne zapalenie wsierdza (IE - infective endocarditis) jest chorobą zapalną o etiologii bakteryjnej lub grzybiczej, która obejmuje natywne wsierdzie, głównie zastawkowe lub sztuczne materiały występujące w sercu (protezy zastawek, naczyń, elektrody stymulatorów, cewniki centralne). Ocenia się, że w Polsce dochodzi do ponad 3000 przypadków IE rocznie [1]. Diagnostyka i leczenie IE, mimo postępu medycyny pozostają nadal dużym wyzwaniem [2,3].

Kluczem do skutecznego leczenia IE jest szybka i dokładna identyfikacja patogenu. Przeprowadza się ją za pomocą metod konwencjonalnych i molekularnych. Metody konwencjonalne obejmują:

1. badanie mikroskopowe pozwalające na identyfikację drobnoustroju na podstawie jego charakterystycznego kształtu (zwykle nie ma zastosowania w diagnostyce IE),
2. hodowlę,
3. identyfikację drobnoustroju na podstawie cech fenotypowych, tj. morfologii kolonii rosnących na podłożach

Adres do korespondencji:

Małgorzata Małek-Elikowska
 II Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
 61-485 Poznań, ul. 28 Czerwca 1956 r. Nr 194,
 tel.: 515378577,
 e-mail: malmalek@wp.pl

stałych oraz cech biochemicznych i immunologicznych. W metodach molekularnych wykorzystuje się natomiast różne techniki wykrywania sekwencji kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA - deoxyribonucleic acid), kwasu rybonukleinowego (RNA - ribonucleic acid) lub białek drobnoustroju [4].

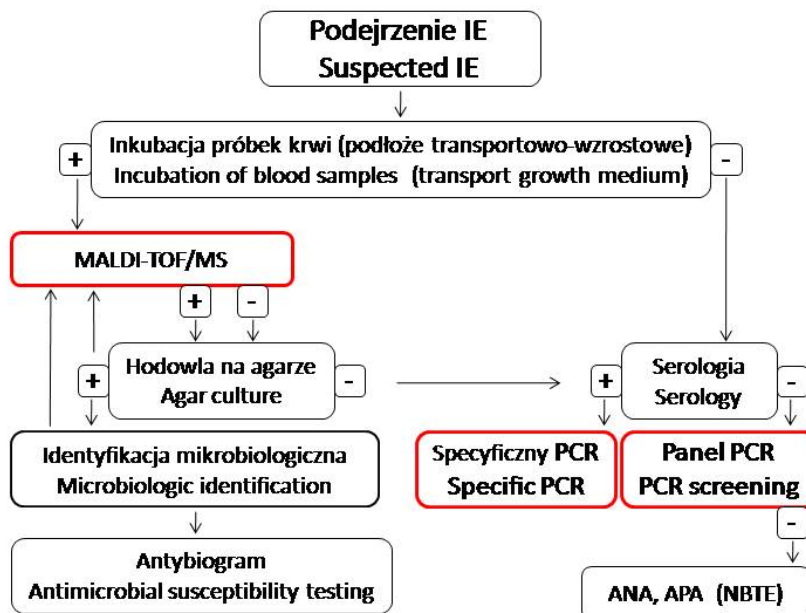
Aktualne wytyczne postępowania w IE opublikowane w 2015r. przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC - European Society of Cardiology) zwracają uwagę na nowość w diagnostyce molekularnej [3]. W poprzednich zaleceniach ESC z 2009r. wskazywano jedynie na przydatność genotypowania, czyli reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR - Polymerase Chain Reaction) [2]. Nową, proponowaną przez ESC metodą jest oparta na analizie sekwencji białek, spektrometria masowa z desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą z analizą czasu przelotu (MALDI-TOF MS - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry).

Diagnostyka mikrobiologiczna IE na podstawie nowych wytycznych ESC

Miejsce konwencjonalnych i molekularnych metod w diagnostyce mikrobiologicznej IE przedstawiono na schemacie ESC zmodyfikowanym przez autorów (Ryc.1).

Diagnostykę mikrobiologiczną IE należy rozpocząć od hodowli próbek krwi pobranych do butelek zawierających podłoża transportowo-wzrostowe. W laboratoriach wykorzystuje się obecnie nowoczesne systemy do inkubacji i detekcji drobnoustrojów np. BacT/ALERT 3D firmy bioMerieux (Ryc. 2) lub BD BACTEC firmy Becton, Dickinson and Company. Czas niezbędny do potwierdzenia dodatniego wyniku próbki wynosi zwykle 24 godziny i zależy od stężenia drobnoustrojów, objętości badanej krwi (zaleca się pobranie 7-10 ml.) oraz specyfiki hodowanego gatunku. Bakterie Gram ujemne wykrywane są często już po 6 godzinach, podczas gdy inkubacja grzybów trwa około 72 godziny. Badanie prowadzone w latach 1996-1997 sugerowało, że użycie automatycznych systemów do inkubacji i detekcji umożliwia wykrycie większości klinicznie istotnych drobnoustrojów, ma również większą czułość i wymaga wykorzystania mniejszej objętości krwi oraz krótszego czasu inkubacji niż wcześniej stosowane metody manualne [5]. Późniejsze doniesienia [6,7] podają jednak mniejszą skuteczność w/w systemów, prawdopodobnie związaną z szeroko stosowaną antybiotykoterapią.

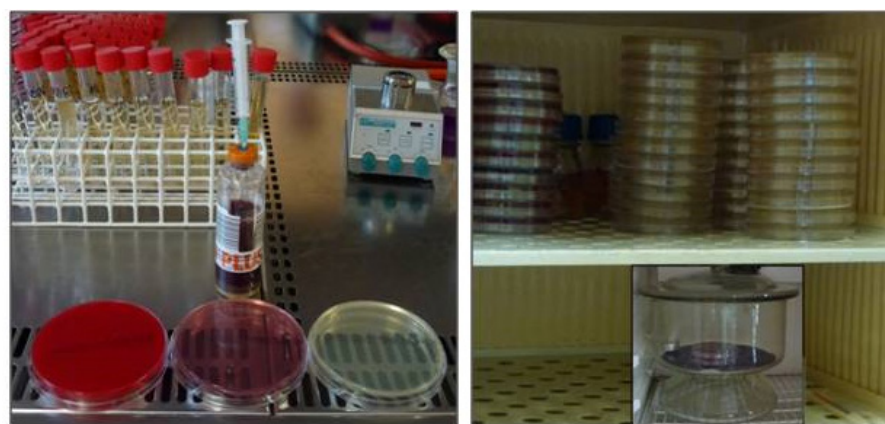
Kolejnym etapem diagnostyki IE jest kontynuacja hodowli na podłożach stałych w ciepłarni, a przy podejrzeniu zakażenia bakterią mikroaerofilną w tzw. ekcykatorze (Ryc.3, Ryc.4). Podłoża stałe stosuje się także dla oceny lekowrażliwości i oznaczenia minimalnego stężenia hamującego antybiotyku (MIC - Minimal Inhibitory Concentration) (Ryc.4). Jednocześnie zaleca się wykonanie badania metodą MALDI-TOF MS. Szybka identyfikacja drobnoustroju metodą MALDI-TOF MS umożliwia wczesne włączenie ukierunkowanej antybiotykoterapii empirycznej. W pracy badaczy japońskich analizujących przypadki IE leczone w latach 2008-2013 oceniono, że 62% chorych otrzymywało, przed uzyskaniem



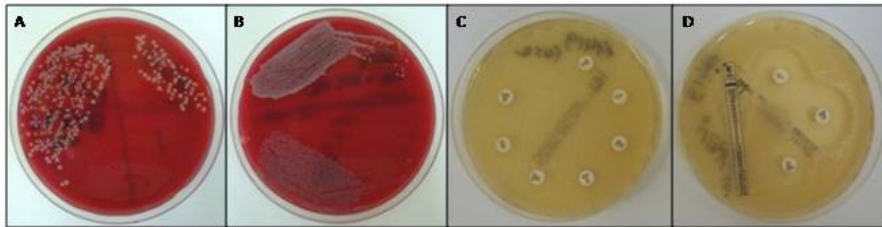
Rycina 1 Miejsce metod konwencjonalnych i molekularnych w diagnostyce IE na podstawie aktualnych wytycznych ESC [3]; modyfikacja autorów. The place of routine and molecular methods in diagnostics of IE based on new ESC guidelines [3]; authors' modification.



Rycina 2 BacT/ALERT 3D - automatyczny system detekcji mikroorganizmów: widok aparatu; komory inkubacyjne, oznakowane kolorami butelki z podłożami transportowo-wzrostowymi dla różnych warunków hodowli (tlenowych, beztlenowych, po antybiotykoterapii), widoczne 2 podświetlone dodatnie próbki; wykres wskazujący czas detekcji; metoda kolorymetryczna oparta na zmianie barwy dna butelki w wyniku wytwarzania CO2 i kwasów organicznych. BacT/ALERT 3D - automated microbial detection system: view of the instrument; incubation chambers, color-coded bottles with transport media for different culture conditions (aerobic, anaerobic, previous antibiotic therapy), two samples lighted as positive; graph showing detection time; colorimetric method based on tint changed of bottle bottom due to production of CO2 and organic acids.



Rycina 3 Najczęściej stosowane stałe podłoża hodowlane: agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (standard), MacConkey (dla bakterii Gram-ujemnych), Sabouraud (dla grzybów); nie uwzględniony na rycinie agar czekoladowy stosuje się m.in. dla grupy HACEK. Inkubacja w ciepłarni (18-24h); ekcykator stosowany do hodowli mikroaerofilnej. Most frequently used culture solid media: agar with 5% sheep blood (general growth medium), MacConkey's agar (for Gram-negative bacteria), Sabouraud agar (for fungi); not shown chocolate agar can be dedicated to HACEK group. Incubation (18-24 h); exicator for microaerophilic culture.



Rycina 4
Charakterystyczny wzrost koloni Staphylococcus aureus: MSSA (A) i MRSA (B). Brak wrażliwości MRSA na rutynowo stosowane antybiotyki (C). Ocena MIC wankomocyny (D).
 Typical growth of Staphylococcus aureus: MSSA (A) and MRSA (B). Lack of MRSA susceptibility for routinely used antibiotics (C). Vancomycin MIC estimation (D).



Rycina 5
VITEK 2 Compact - automatyczny system identyfikacji i oceny lekowrażliwości: widok aparatu; próbówki zawierające zawiesiny drobnoustrojów; karta identyfikacyjna przed użyciem oraz po przeprowadzeniu testów.
 VITEK 2 Compact - automated identification/antimicrobial susceptibility testing system: view of the instrument; test-tubes containing pathogen solutions; identification card before and after testing.

wyniku mikrobiologicznego, niewłaściwą antybiotykoterapię [8].

Wyhodowany szczep poddaje się testom biochemicznym w celu precyzyjnego określenia gatunku patogenu oraz testom określającym jego lekowrażliwość np. za pomocą automatycznego systemu do identyfikacji i oznaczenia lekowrażliwości drobnoustrojów VITEK 2 Compact firmy bioMérieux (Ryc.5) lub Phoenix BD Diagnostic System firmy Becton, Dickinson and Company. Ostateczny wynik w zakresie lekowrażliwości interpretuje się zgodnie z rekomendacjami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczenia Lekowrażliwości (EUCAST-The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Jeżeli po upływie 3-5 dni od początku hodowli nie obserwuje się wzrostu drobnoustrojów wstępnie rozpoznaje się zapalenie wsierdzia z ujemnymi posiewami krwi (BCNE - blood culture-negative endocarditis) i zaleca się konsultację ze specjalistą w dziedzinie mikrobiologii [3].

Infekcyjne zapalenie wsierdzia z ujemnymi posiewami krwi

BCNE dzieli się na 3 kategorie: 1. IE w przypadkach wcześniej stosowanej antybiotykoterapii (zwykle wywołane przez paciorkowce, rzadziej gronkowce lub enterokoki),

2. IE spowodowane przez mikroorganizmy wymagające specjalnych warunków wzrostu lub dłuższej, kilkudniowej inkubacji (bakterie z grupy HACEK, Streptococcus defectiva np. Gemella, Granulicatella, Abiotrophia lub grzyby np. Candida species), 3. „prawdziwe” BCNE spowodowane bakteriami wewnątrzkomórkowymi (Bartonella species, Coxiella burnetti, Tropheryma whipplei) wykrywanych metodami molekularnymi lub testami serologicznymi [9].

Początkowa diagnostyka IE w przypadku BCNE zależy od lokalnej epidemiologii i obejmuje wykonanie testów serologicznych dla Coxiella burnetti, Bartonella henselae, Bartonella quintana, Aspergillus species, Mycoplasma species, Brucella species, Legionella pneumophila, a następnie, po uzyskaniu wyniku dodatniego, wykonanie potwierdzającego, specyficznego testu PCR. W razie ujemnego wyniku identyfikacji przeciwciał zaleca się wykonanie PCR w kierunku Staphylococcus aureus, Tropheryma whipplei, Escherichia coli, Streptococcus gallolyticus, Streptococcus mitis, enterokoków i grzybów [3].

Większość autorów uważa, że częstość rozpoznawania BCNE pozostaje od lat na poziomie 5-31% [2,6,7], jednak w niektórych doniesieniach odsetek BCNE wynosił 40% [10], a nawet 70% [11,12]. Zastosowa-

nie PCR i testów serologicznych poprawia skuteczność diagnostyki BCNE, chociaż dane z różnych ośrodków znacznie odbiegają od siebie. W specjalistycznym ośrodku The French National Reference Center for Rickettsia Diseases, gdzie w latach 1983-2001 przebadano 348 chorych z wstępnym rozpoznaniem BCNE, ostateczny odsetek negatywnych wyników wynosił zaledwie 1% [13]. Z kolei w ośrodku egipskim po przeprowadzeniu poszerzonej diagnostyki BCNE, odsetek ten był wielokrotnie wyższy [11].

Należy zdecydowanie podkreślić, że największy wpływ na częstość występowania BCNE ma wcześniej stosowana antybiotykoterapia [14,15]. Niewielki procent BCNE zostaje ostatecznie zdiagnozowany jako niebakteryjne zakrzepowe zapalenie wsierdzia (NBTE - nonbacterial thrombotic endocarditis).

Niebakteryjne zakrzepowe zapalenie wsierdzia

NBTE charakteryzuje się obecnością w sercu jałowych wegetacji zbudowanych z włókienka i płytek krwi [3]. NBTE występuje najczęściej w chorobie nowotworowej oraz schorzeniach autoimmunologicznych [16-18]. W ramach diagnostyki różnicowej pomiędzy IE a NBTE konieczne jest oznaczenie przeciwciał przeciwjądrowych i antyfosfolipidowych (antykoagulant tarczynowy, przeciwciała antykardiolipidowe oraz przeciw β -2 glikoproteinie), a u pacjentów z biologiczną zastawką świńską przeciwciał przeciwko antygenom tej zastawki [3]. Fournier i wsp. w grupie 819 chorych z BCNE zdiagnozowali NBTE u 2,5 % osób [7].

Ocena materiału usuniętego w trakcie operacji kardiochirurgicznej

Podkreśla się, że materiał uzyskany podczas operacji kardiochirurgicznej chorych z IE (zastawki natywne, sztuczne, protezy naczyniowe, elektrody) należy poddać hodowli, badaniu histopatologicznemu oraz testom PCR [3]. Procedury te powinny dotyczyć również usuniętych metodami przeszskórnymi elektrod i cewników. Nie znaleziono w polskim piśmiennictwie danych o wykorzystaniu PCR w diagnostyce pooperacyjnej IE.

Spektrometria masowa z desorpcją/jonizacją laserową wspomaganą matrycą i z analizą czasu przelotu

Metoda MALDI-TOF MS oparta jest na analizie unikatowego dla każdego gatunku drobnoustroju profilu białkowego, tzw. molekularnego odcisku palca. Ocena profilu białek rybosomalnych badanego drobnoustroju i jego porównanie do wzorcowego zestawu białek drobnoustroju referencyjnego umożliwia określenie gatunku lub rodzaju mikroorganizmu. Pozwala to na identyfikację bakterii, grzybów drożdżopodobnych oraz strzępkowych, jak i na określenie pokrewieństwa w obrębie izolatów tego samego gatunku [19,20]. Technika ta została opracowana w 1988r. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA - Food and Drug Administration) zatwierdziła jej kliniczną przydatność w 2013 r. W laboratoriach wykorzystywane są systemy Biotyper firmy Bruker Daltonics i VITEK

MS firmy bioMérieux. Do przeprowadzenia badania wystarczy materiał zawierający 10^5 komórek (pojedyncza kolonia lub próbka hodowli płynnej). Dodatnią próbkę krwi hoduje się na podłożu stałym, następnie kolonie drobnoustrojów podlegają procesowi ekstrakcji z użyciem etanolu i kwasu mrówkowego, przenosi się je na specjalną płytkę, pokrywa matrycą (matrix) i umieszcza w komorze urządzenia. Tam materiał jest poddawany działaniu promieniowania laserowego. Matryca, która jest najczęściej słabym kwasem, odgrywa kluczową rolę, gdyż absorbuje energię światła laserowego. Pod jego wpływem dochodzi do desorpcji, czyli niedestruktywnego odparowania i jonizacji białek drobnoustrojów. Następnie zjonizowane peptydy ulegają przyspieszaniu w silnym polu elektrycznym, a ich czas przelotu (time of flight) podlega pomiarowi. W oparciu o otrzymany rozkład peptydów według masy cząsteczkowej, ładunku oraz zróżnicowanego czasu przelotu system generuje spektrometryczne widma i porównuje je z widmami referencyjnymi z bazy, która zawiera dane kilku tysięcy profili drobnoustrojów. Cała procedura trwa 30-40 sekund (z przygotowaniem próbki kilka minut) [21]. Należy jednak pamiętać, że czas niezbędny do uzyskania materiału biologicznego do badania, czyli czas wstępnej hodowli wynosi, jak wspomniano wyżej, najczęściej około 24 godziny, ale bywa zdecydowanie dłuższy w przypadku bakterii beztlenowych i grzybów [22].

Omawiana metoda nie wymaga szczególnego sposobu przygotowania próbki. Stałe rozbudowywana i aktualizowana baza mikroorganizmów umożliwia rozpoznawanie coraz większej liczby ich gatunków z wiarygodnością porównywalną z metodami biochemicznymi [23]. System jest szczególnie pomocny w identyfikacji rzadkich gatunków, jak również potrafi odróżnić szczepy antybiotykooporne np. Gronkowca złocistego metycylinoopornego (MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) od wrażliwego na metycylinę (MSSA - methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) [24]. Ma też zastosowanie w przypadku infekcji gatunkami odzwierzęcymi i u pacjentów ze schorzeniami przewlekłymi. W publikowanych doniesieniach można znaleźć informacje o rozpoznaniu tą metodą rzadkich patogenów wywołujących IE. Badacze hiszpańscy zidentyfikowali za pomocą MALDI-TOF MS Gram-dodatni *Lactococcus garvieae*, który metodą konwencjonalną został sklasyfikowany jako *Enterococcus* genus [25]. Z kolei badacze francuscy opisali pierwszy od 50 lat przypadek IE spowodowanego przez *Moraxella osloensis* [26]. Metoda MALDI-TOF MS przyczyniła się również do weryfikacji znaczenia niektórych patogenów. Abiotrophia defectiva, paciorkowec, będący składnikiem prawidłowej flory przewodu pokarmowego i moczowego, jest prawdopodobnie odpowiedzialny za większą niż wcześniej sądzono liczbę przypadków BCNE [27-29]. Z kolei *Helicobacterium kunzii*, komensalna bakteria bytująca na skórze, odkryta w 1993 r., została po raz pierwszy w 2015 r. rozpoznana jako czynnik etiologiczny IE [30]. Interesujące są doniesienia porównujące MALDI-TOF MS z

metodą konwencjonalną. W tych analizach, dzięki MALDI-TOF MS zidentyfikowano drobnoustroje na poziomie 91% - 100% w obrębie gatunku lub rodzaju [15,31-33]. Odsetek wyników dodatnich był zbliżony w obu metodach, jednak na korzyść nowszej procedury przemawiał krótki czas badania i niskie koszty uzyskania wyniku. Przypadki wątpliwe poddawano dodatkowo badaniu 16S rRNA PCR traktowanemu jako złoty standard.

Pojawiły się również doniesienia, co zostało uwzględnione w wytycznych (Ryc.1), o próbach identyfikacji drobnoustrojów z dodatniej próbki krwi uzyskanej bezpośrednio z podłoża transportowo-wzrostowego (bez wstępnej hodowli na podłożu stałym) [34,35]. Jednak zbyt mała liczba bakterii i brak określonego protokołu badania stanowią, jak dotąd, ograniczenia takiego wykorzystania omawianej metody.

Nowym kierunkiem w mikrobiologii zajmującym się identyfikacją drobnoustrojów bez uprzedniej hodowli jest metagenomika, polegająca na klonowaniu DNA bezpośrednio ze środowiska. Opublikowano pojedyncze opisy wykorzystania metagenomiki w diagnostyce IE, zwłaszcza BCNE [36,37].

Mimo wielu zalet MALDI-TOF MS ma również wady. Najważniejsza z nich to brak możliwości ustalenia lekowrażliwości oraz w polskich warunkach, wysoki koszt badania i znikoma jego dostępność. Wyboru antybiotyku można dokonać empirycznie na podstawie rozpoznania patogenu metodą MALDI-TOF MS, sugeruje się jednak wykonanie klasycznego antybiogramu i/lub pomiaru MIC [3]. Trudności diagnostyczne można napotkać w przypadku wysokiego pokrewieństwa filogenetycznego drobnoustrojów, oznaczającego podobny profil białkowy, a także w przypadku ograniczonej bazy profili referencyjnych. Istnieją sprzeczne doniesienia co do możliwości analiz próbek z zakażeniami mieszanymi [38,39].

Reakcja łańcuchowej polimerazy

PCR - klasyczny, jak i ilościowy (quantitative PCR), zwany również PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR), jest badaniem z zakresu biologii molekularnej, które pozwala na identyfikację mikroorganizmu na podstawie cech genotypowych, bez przeprowadzenia wstępnej hodowli. Obie metody są obecnie wykorzystywane do stwierdzenia obecności drobnoustrojów, genów kodujących toksyny bakteryjne lub mechanizmów oporności na antybiotyki. Metoda PCR, opracowana w 1977r., oparta jest na analizie genu kodującego podjednostkę rybosomu 16S rRNA. Wykorzystuje ona fakt, że gen kodujący 16S rRNA jest obecny u wszystkich bakterii [4]. W przypadku grzybów analizie podlega gen 18S rRNA [40]. Zbadanie sekwencji genu pozwala na precyzyjne określenie przynależności gatunkowej drobnoustroju. Wstępnie przeprowadza się reakcję amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA [41] lub 18S rRNA [40], dalej ocenia się produkty tego procesu techniką elektroforezy na żelu agarozowym i porównuje się z wzorcowym DNA z bazy danych globalnego serwera genetycznego - GenBanku. Wallet i wsp.[42] opisali przypadek IE spowodowany *Cardiobacterium hominis*, bakterii z

grupy ACEK (*Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*), długo rosnącej, trudno wykrywalnej, u chorego wcześniej leczonego antybiotykiem. System identyfikacji biochemicznej VITEK 2 nie rozróżnił dwóch gatunków (*hominis* i *vulgaris*) tej bakterii. Wykorzystano metodę 16S rRNA PCR znajdując odpowiednią sekwencję genów w systemie GenBank. Rozpoznanie gatunku potwierdzono badaniem MALDI-TOF MS na podstawie bazy systemu Biotyper [42].

Technika PCR ma znaczące zastosowanie w badaniu zastawek usuniętych w trakcie operacji, szczególnie w przypadku BCNE [10,14,43-45]. Badacze duńscy opisali pierwszy przypadek IE w przebiegu zakażenia *Bartonella quintana* u pacjenta pochodzącego z Grenlandii. Wielokrotne posiewy krwi były ujemne, dopiero badanie usuniętej zastawki metodą 16S rRNA PCR dało właściwe rozpoznanie, które zostało potwierdzone testami serologicznymi z krwi pacjenta [46]. W 2014r. opisano pierwszy przypadek IE spowodowanego przez *Helicobacter cinaedi* u pacjenta z BCNE, potwierdzonego badaniem PCR usuniętej zastawki aortalnej [47]. PCR znajduje szczególne zastosowanie przy podejrzeniu etiologii grzybiczej, która występuje u mniej niż 2% wszystkich rozpoznanych IE. Spotyka się ją najczęściej u chorych z nowotworami układu krwiotwórczego, poddawanych immunosupresji, leczonych wcześniej antybiotykami, stosujących dożylnie środki narkotyczne, a także po operacjach kardiologicznych [40]. W tych przypadkach prawie zawsze posiewy krwi są ujemne [48]. Badaniem pomocniczym, nie ujętym w schemacie diagnostycznym ESC, może być test serologiczny na obecność galaktomannanu, polisacharydu wchodzącego w skład ściany grzybów z rodzaju *Aspergillus* [49-51].

PCR umożliwia szybką identyfikację drobnoustroju oraz genów antybiotykooporności, jednak bez klasycznego antybiogramu [52].

Metodą, która łączy omawiane techniki molekularne jest PCR z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym i spektrometrią masową (PCR/ESI-MS - Electrospray Ionisation Mass Spectrometry) [53,54].

Podsumowanie

Nowe wytyczne ESC postępowania w IE z 2015r. wprowadziły do panelu diagnostyki mikrobiologicznej molekularną metodę MALDI-TOF MS. Mimo wzrastającej liczby doniesień dotyczących praktycznego jej wykorzystania, metoda ta nie jest szeroko rozpowszechniona. Przeprowadzono jak dotąd niewiele badań porównujących możliwości rozpoznania patogenu na podstawie tej metody i hodowli konwencjonalnej lub PCR. W polskim piśmiennictwie brak jest doniesień o wykorzystaniu MALDI-TOF MS w diagnostyce IE. Największą zaletą metody MALDI-TOF MS jest krótki czas, po którym uzyskuje się identyfikację drobnoustroju. Główne jej wady to konieczność wyhodowania drobnoustroju z krwi i brak możliwości ustalenia lekowrażliwości.

Metody 16S rRNA i 18S rRNA PCR nie wymagają hodowli drobnoustroju do jego identyfikacji, ale również nie pozwalają na ocenę lekowrażliwości. Nadal najszerzej

stosowana pozostaje hodowla drobnoustroju i opracowanie antybiogramu. W przyszłości do detekcji patogenów IE będą zapewne wykorzystywane mikromacierze (chipy) DNA [55,56].

Piśmiennictwo

- Lelakowski J: Rozpoznawanie infekcyjnego zapalenia wsierdza. *Folia Cardiol Exc.* 2009; 4:78-82.
- Habip G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B. et al: Guidelines on the prevention, diagnosis and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC), endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J.* 2009; 30: 2369-2413.
- Habip G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorno MG, Casalta JP. et al: 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), The European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J.* 2015; 36: 3075-3128.
- Żabicka D: Metody detekcji i identyfikacji bakterii. Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków. Warszawa. ichf.edu.pl/r_act/acct_pl/fund_strukt/KSP/zabicka.pdf.
- Cockerill FR, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA. et al: Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 1724-1730.
- Abramczuk E, Stępińska J, Hryniewiecki T: Twenty-year experience in the diagnosis and treatment of infective endocarditis. *PLoS One* 2015;10: e1134021.
- Fournier PE, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta JP. et al: Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: 131-140.
- Fukuchi T, Iwata K, Ohji G: Failure of early diagnosis of infective endocarditis in Japan - a retrospective descriptive analysis. *Medicine (Baltimore).* 2014; 93: e237.
- Tattevin P, Watt G, Revest M, Arvieux C, Fournier PE: Update on blood culture-negative endocarditis. *Med Mal Infect.* 2015; 45: 1-8.
- Lamas CC, Fournier PE, Zappa M, Brandao TJ, Januario-da-Silva CA. et al: Diagnosis of blood culture-negative endocarditis and clinical comparison between blood culture-negative and blood-culture-positive cases. *Infection.* 2015 [Epub ahead of print].
- El-Kholy AA, El-Rachidi NG, El-Enany MG, AbdulRahman EM, Mohamed RM. et al: Impact of serology and molecular methods on improving the microbiologic diagnosis of infective endocarditis in Egypt. *Infection.* 2015; 43: 523-529.
- Topan A, Carstina D, Slavcovi A, Rancea R, Capalneau R. et al: Assessment of the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis after twenty-years. An analysis of 241 cases. *Clujul Med.* 2015; 88: 321-326.
- Houpikian P, Raoult D: Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine (Baltimore).* 2005; 84: 162-173.
- Le Guern R, Loiez C, Armand S, Marceau L, Courcol R. et al: Infective endocarditis: does a new 16S rDNA set of primers improve microbiological diagnosis? *Infect Dis (Lond).* 2015; 47: 896-901.
- Ling G, Liyan Y, Yanping L: Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J Thorax Dis.* 2014; 6: 534-538.
- Dahl A, Schaadt BK, Santoni-Rugiu E, Bruun NE: Molecular imaging in Libman-Sacks endocarditis. *Infect Dis (Lond).* 2015; 47: 263-266.
- Elikowski W, Jarzabek R, Malek M, Witzczak W, Łazowski S. i wsp: Niebakteryjne zakrzepowe zapalenie wsierdza na dwupłatkowej zastawce aortalnej u 25-letniego mężczyzny z antykoagulantem tocniowym. *Pol Merk Lek.* 2016; 40: 182-185.
- Wang LW, Noel B, Dascloux E, Baron DW: Antiphospholipid syndrome: an important differential diagnosis for culture-negative endocarditis. *Am J Med.* 2015; 128: 1882-884.
- Kosikowska U, Stępień-Pyśniak D, Pietas-Ożga D, Andrzejczuk S, Juda M. i wsp: Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF MS w identyfikacji bakterii izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zwierząt. *Diagn Lab.* 2015; 51: 23-30.
- La Scola B, Rolad D: Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009; 4: e8041.
- Product description, Bruker GmbH. www.bruker.com/products/mas-spectrometry-and-separations/maldi-toftof.html.
- Croxatto A, Prodhom G, Greub G: Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36: 380-407.
- Nagy F, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M: Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 8: 796-802.
- Walker J, Fox AJ, Edwards-Jones V, Gordon DB: Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus*: media effects and inter laboratory reproducibility. *J of Micr Meth.* 2002; 48: 117-126.
- Heras Canas V, Peres Ramires MD, Bermudez Jimenes F, Rojo Martin MD, Miranda Casas C. et al: Lactococcus garvieae endocarditis in a native valve identified by MALDI-TOF MS and PCR based 16S rRNA in Spain: a case report. *New Microbes New Infect.* 2015; 5: 3-15.
- Gagnard JC, Hidri N, Grillon A, Jesel L, Denes E: Moraxella osloensis an emerging pathogen of endocarditis in immunocompromised patients? *Swiss Med Wkly.* 2015; 145: w14185.
- Alberti MO, Hindler JA, Humphries RM: Antimicrobial susceptibility of Abiotrophia defectiva, Granulicatella adiacens, and Granulicatella elegans. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015. pii: AAC.02645-15. [Epub ahead of print].
- Bajaj A, Rothor P, Sethi A, Sehgal V, Ramos AJ: Aortic valve endocarditis by rare organism: Abiotrophia defectiva. *J Clin Exp Cardiol.* 2013; 4: 276.
- Holler JG, Pedersen LK, Culum H: Using MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid and accurate diagnostic tool in infective endocarditis. A case report of a patient with mitral valve infective endocarditis caused by Abiotrophia defectiva. *Scand J Infect Dis.* 2011; 43: 234-237.
- Lotte R, Lotte L, Degand N, Gaudart A, Gabriel S. et al: Infectious endocarditis caused by Helcococcus kunzii in a vascular patient: a case report and literature review. *BMC Infect Dis.* 2015; 15: 238.
- Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Schellenberger W, Eschrich K: Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2392-2397.
- Lee W, Kim M, Yong D, Jeong SH, Lee K. et al: Evaluation of VITEK mass spectrometry (MS) matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight ms system for identification of anaerobic bacteria. *Ann Lab Med.* 2015; 35: 69-75.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE. et al: Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 543-451.
- Fortheggill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T. et al: Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 805-809.
- Nagy F, Abrok M, Bartha L, Bereczki L, Juhasz E. et al: Special application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiological diagnostic. *Orv Hetil.* 2014; 155: 1495-1503.
- Fukui Y, Aoki K, Okuma S, Sato T, Ishii Y. et al: Metagenomic analysis for detecting pathogens in culture-negative infective endocarditis. *J Infect Chemother.* 2015; 21:882-884.
- Imai A, Gotoh K, Asano Y, Yamada N, Motooka D. et al: Comprehensive metagenomic approach for detecting causative microorganisms in culture-negative infective endocarditis. *Int J Cardiol.* 2014; 172: e288-289.
- Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A. et al: Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Mol Diagn.* 2011; 13: 701-706.
- Zhou N, Wang N, Xu B, Wang J, Fang J. et al: Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria cultured in liquid media. *Sci China Life Sci.* 2011; 54: 48-53.
- Tattevin P, Revest M, Lefort A, Michelet C, Lortholary O: Fungal endocarditis: current challenges. *Int J Antimicrobiol Agents.* 2014; 44: 290-294.
- Jenkins C, Ling LC, Ciesielczuk HL, Lockwood J, Hopkins S. et al: Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *J Med Microbiol.* 2012; 61: 483-488.
- Wallet F, Loiez C, Decoene C, Courcol R: Rapid identification of *Cardiobacterium hominis* by MALDI-TOF mass spectrometry during infective endocarditis. *Jpn J Dis.* 2011; 64: 327-329.
- Edouard S, Nebet C, Lepid H, Fournier PE, Raoult D: Bartonella, a common cause of endocarditis: a case report on 106 cases and review. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 824-829.
- Marsch G, Orszag P, Mashaqi B, Kuehn C, Have-rich A: Antibiotic therapy following polymerase chain reaction diagnosis of infective endocarditis: a single centre experience. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2015; 20: 589-593.
- Pachirat O, Watt G, Pussadhamma B: First case of tricuspid valve endocarditis caused by *Gemella bergeni*. *Case Rep Med.* 2015; 2015: 704785-704787.
- Jansen CL, Dargis R, Bundgaard H, Moser C, Christensen JJ. et al: Infective endocarditis caused by *Bartonella quintana* in Greenland. *JMM Case Rep.* 2014; DOI 10.1099/jmmcr.0.003475.
- Bartels H, Goldenberger D, Reuthebuch G, Vosbeck J, Weisser M. et al: First case of infective endocarditis caused by *Helicobacter cinaedi*. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 586.
- Badiee P, Amirhofran AA, Ghazi Nour M: Evaluation of noninvasive methods for the diagnosis of fungal endocarditis. *Med. Mycol.* 2014; 52: 530-536.
- Kalokhe AS, Roupael N, El Chami MF, Workowski KA, Ganesh G. et al: Aspergillus endocarditis: a review of the literature. *Int J Infect Dis.* 2010; 14: e1040-e1047.
- McCormack J, Pollard J: Aspergillus endocarditis 2003-2009. *Med Mycol.* 2011; 49: S30-34.
- Verdaguer V, Walsh TJ, Hope W, Cortez KJ: Galactomannan antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2007; 7: 21-32.
- Di Carlo P, D'Alessandro N, Guadagnino G, Bonura C, Mammina C. et al: High dose of trimethoprim-sulfamethoxazole and daptomycin as a therapeutic option for MRSA endocarditis with large vegetation complicated by embolic stroke: a case report and literature review. *Infez Med.* 2013; 21: 45-49.
- Brinkman CL, Vergidis P, Uhl JR, Pritt BS, Cockerill FR. et al: PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 2040-2046.
- Wallet F, Herwegh S, Decoene C, Courcol RJ: PCR-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry: a new tool for the diagnosis of infective endocarditis from heart valves. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 76: 125-128.
- Kondak K: Molekulare metody diagnostyki mikrobiologicznej. *J Lab Diagn.* 2009; 45: 325-331.
- Rasmussen G, Monecke S, Ehrlich R, Soderquist B: Prevalence of clonal complexes and virulence genes among commensal and invasive *Staphylococcus* isolates in Sweden. *PLoS One.* 2013; 8: 10.