

МИКРОБИОЛОГИЯ ПРИ ИНФЕКЦИОЗЕН ЕНДОКАРДИТ

Доц. г-р Бойка Маркова

Лаборатория по клинична микробиология, УМБАЛ "Александровска"

ВЪВЕДЕНИЕ

Инфекциозният ендокардит (ИЕ) е животозастрашаваща инфекция, при която некоректно или късно поставената диагноза крие риск от тежки последици, вкл. фатален изход. При фебрилен пациент с нов или променящ се сърдечен шум, с ехокардиографски доказана везетация и позитивни хемокултури, диагнозата се поставя относително лесно. Клиничната диагноза обаче е трудна в случаите, когато проявите на ендокардита са неспецифични и вариабилни, а микробиологичното изследване е с негативен или несигурен резултат.

Микробиологичната диагностика се базира на културелни, серологични, хистологични, имуно-хистологични, електронно-микроскопски и молекулярно-генетични методи.

Рутинните културелни методи се считат за „златен стандарт“, но изискват време и не обхващат всички причинители на ендокардита.

Съкращаване на времето за отговор с 24-48 часа се постига с различни автоматизирани системи за скрининг на хемокултури, за биохимична идентификация и определяне на чувствителността на изолираните щамове към антибиотици. С такива техники са оборудвани повечето микробиологични лаборатории на големите болници в страната.

Серологичните методи дават ретроспективна диагноза и намират приложение, когато се подозират възискателни причинители. Най-често използвани методи са аглутинацията (*Brucella melitensis*), **индиректната имунофлуоресценция** (*Legionella pneumophila*, *Clamydia*), **ELISA** (*Mycoplasma pneumoniae*), **РСК** (*Chlamydia*). **Резултатите** от серологичните изследвания трябва да се интерпретират внимателно от гледна точка на възможните кръстосани реакции.

Хистологичното изследване на тъкани има важно приложение в диагностиката на ИЕ. Наред с обичайното оцветяване с хематоксилин и еозин, са разработени редица специални методи: оцветяване на тъкани по **Gram**; **PAS-метод** (*T. whipplei*; **Fungi**); оцветяване по **Giemsa** (*Bartonella*); **Warthin-Starry метод** със **сребърно импрегниране** (*Bartonella*); оцветяване по **Gimenez** (*C. burnetii*, *Legionella*); оцветяване по **Ziehl-Nielsen** (*Mycobacterium*); **метенамин-сребърно оцветяване** по **Grocott-Gomori** (**Fungi**) и др.

Имуно-хистологичните тестове се използват за откриване на *Coxiella burnetii*, *Bartonella* и *Chlamydia* в тъкан от клапи. Използват се няколко техники: **ELISA/ELIFA** система, директна имунофлуоресценция с флуоресцент-конюгирани моноклонални антители и имуно-пероксидазно оцветяване.

Модерните молекулярно-генетични методи, базирани на амплификация на нуклеиновите киселини чрез полимеразно-верижна реакция (**PCR**), са **особено полезни** за откриване и идентифициране на нови или некултивируеми патогени. Тези методи са все още в процес на разработка и стандартизация и понастоящем са приоритет само на научно-изследователските лаборатории и някои големи диагностични центрове.

Електронно-микроскопско изследване обикновено се извършва, когато няма резултат след изпълнение на по-горе изброените методи.

СЪВРЕМЕННИ МИКРОБИОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Вероятно няма микроорганизъм, който да е изолиран от кръв и да не е идентифициран като причинител на ИЕ. Най-чести етиологични агенти, обаче са Грам (+) бактерии от роговете *Streptococcus*, *Staphylococcus* и *Enterococcus*.

Стрептококите са най-често доказваните патогени при ИЕ на нативни клапи (45-65% от случаите на възраст между 15-60 години) и късен ИЕ след клапно протезиране (30-35%). Представени са предимно от видове на *Viridans*-групата: *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. anginosus*, *Abiotrophia defectiva* и *Granulicatella* spp. (*pyridoxal-hydrochloride/L-cysteine* зависими щамове) и *Gemella morbillorum*. Относително рядко участие имат бета-хемолитичните стрептококи (главно *S. bovis*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*) и *S. pneumoniae*. Повечето стрептококи са високо чувствителни към Penicillin G ($MIC \leq 0.1 \text{ mg/l}$). В последните 1-2 десетилетия обаче се наблюдава нарастване в честота на изолация на стрептококови щамове, които са с междинна чувствителност ($MIC > 0.1 - \leq 0.5 \text{ mg/l}$), резистентност ($MIC > 0.5 \text{ mg/l}$) или толерантност към Penicillin ($MBC = / > 32 \text{ MIC}$).

Стафилококите са вторите по честота причинители на ИЕ. *S. aureus* се изолира най-често като причинител на ИЕ при венозни наркомани (50%), ИЕ на нативни клапи и кърмачета на възраст под 2 месеца (40-50%) и ранен ИЕ след клапно протезиране (20-25%). Коагулаза-негативни стафилококи, главно *S. epidermidis*, се доказват най-често при пациенти с ИЕ след клапно протезиране (30-35%). Резистентността към Penicillin G е характеристика за над 80-90% от стафилококите. Варираща, но с тенденция към нарастване е честотата на изолация на Methicillin-резистентни щамове (MRSA/MRS), главно сред причинителите на нозокомиален ИЕ. MRSA/MRS са често пъти резистентни към антибиотици от групи класове: Aminoglycosides, Fluoroquinolones, Macrolides, Lincosamides, Sptreptogramins, Tetracyclines, Trimethoprim/Sulfamethoxazole). Някои мултирезистентни щамове се оказват чувствителни само към резервни или нови антибиотици (Glycopeptides, Linezolid). Заплаха за терапията са описаните напоследък щамове MRSA с намалена чувствителност или резистентност към Glycopeptides (VISA/VRSA).

Ентерококова етиология имат 5 до 15% от пациентите с ИЕ след клапно протезиране и под 1 до 10% от пациентите с ИЕ на нативни клапи. Най-често изолирани видове са *E. faecalis* и *E. faecium*. Ентерококите се характеризират с вродено ниско ниво на резистентност към повечето използвани в практиката антибиотици (Penicillin G, Ampicillin/Amoxicillin, Cephalosporins, Aminoglycosides), което изисква приложението на синергични антибиотични комбинации в терапията на причинени от тях инфекции. Освен това ентерококите могат лесно да придобият гени на резистентност от други бактерии и да проявят мултирезистентност, както и да предават резистентни гени на други бактерии (напр. *vanA*-ген, определящ резистентност на *S. aureus* към Vancomycin). Щамове с придобита резистентност показват обикновено антибиотична устойчивост във високи нива (напр. $MIC_{\text{Gentamicin}} > 500 \text{ mg/l}$, $MIC_{\text{Streptomycin}} > 2000 \text{ mg/l}$, $MIC_{\text{Vancomycin}} > 128 \text{ mg/l}$).

Аеробни/факултативно анаеробни Грам (-) бактерии (Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp.) се изолират главно от пациенти с ранен ИЕ след клапно протезиране (10-15%) и ИЕ у венозни наркомани (15-20%). Висок процент от щамовете на тези бактерии могат да бъдат мултирезистентни, особено когато ИЕ е резултат на нозокомиална инфекция.

Гъбни причинители (главно *Candida* spp.) се откриват в около 5-10% от паци-

ентите с клапни протези, както и при венозни наркомани с ИЕ. При последните изолацията на полимикробни асоциации е с подобна честота.

Културелно негативен ендокардит (КНЕ) се диагностицира в близо 20% от случаите. КНЕ е обичайна находка при пациенти на текуща антимикробна терапия, когато причинителите са възискателни микроорганизми или когато клиничната симптоматика е проява на системни заболявания и не е свързана с инфекция.

ВЗИСКАТЕЛНИ ПАТОГЕНИ, КОИТО СЕ ТЪРСЯТ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПОДОЗРЕНИЕ ЗА КНЕ ПРИ НАЛИЧИЕ НА ВАЖНИ АНАМНЕСТИЧНИ И ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ ДАННИ

Професионална обусловеност - фермери, ветеринари - месари, рибари, домакини	<i>Coxiella burnetii</i> , <i>Brucella</i> <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
Циротици, алкохолици	<i>Bartonella quintana</i> , <i>Erysipelothrix</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Listeria</i>
Бездомни	<i>Bartonella quintana</i>
Бременни	<i>Listeria monocytogenes</i>
Пациенти с клапна протеза, ограскани/ ухапани от коза	<i>Coxiella burnetii</i> , <i>Brucella</i>
Ограскани/ухапани от - куче, котка - плъх	<i>Bartonella henselae</i> , <i>Pasteurella</i> <i>Streptobacillus moniliformis</i>
Медицински пиявици	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Венозни наркомани +/- AIDS	<i>Neisseria sicca</i> , <i>Neisseria subflava</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Candida</i>
Десностранен ендокардит при венозни наркомани с AIDS	<i>Salmonella</i>
Пациенти с уроинфекция	<i>Enterobacteriaceae</i>
Пациенти с STD	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Пациенти с хронична диария	<i>Tropheryma whippelii</i>
Пациенти с гастроентерит	<i>Salmonella</i>
Пациенти с пневмонит	<i>Chlamydia psittaci</i>
Пациенти със синусит	<i>Haemophilus influenzae</i>
Пациенти след отворена сърдечна хирургична манипулация	<i>Legionella</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i>
Пациенти след зъбни процедури	HACEK*, <i>Campylobacter fetus</i> , <i>Gemella</i> , <i>Lactobacillus</i>

* *Haemophilus spp.* (*H. parainfluenzae*, *H. influenzae*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella (K. kingae, K. denitrificans)*

МИКРОБИОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С КНЕ

Bartonella

- Инокулиране на кръв/клапен материал в тъканна култура и на кръвен агар
- Имунохистохимичен метод за откриване на бактерии в клапен материал чрез оцветяване със сребро по Warthin-Starry
- Серологично изследване чрез имунофлуоресцентен метод
- PCR за доказване на цитрат-синтазен ген (*glfA*) с идентифициране на ДНК чрез секвенциален анализ

Mycobacterium

- Инокулиране на кръв в Middlebrook-агарова среда или флакон с микобактериален бульон за системата Bactec 9000

- Хистологично изследване на клапен материал за микобактерии след оцветяване по Ziehl-Neelsen
- PCR

Mycoplasma

- Инокулиране на кръв/клапен материал в PPLO-агарова среда или микплазмен бульон без добавка на натриев полианетолсулфонат
- Хистологично изследване на включен в парафин клапен материал
- PCR

Tropheryma whippelii

- Хистологично изследване на клапен материал за доказване на PAS-позитивни макрофаги
- Изолитране на чиста микробна култура чрез инокулиране на кръв/клапен материал в човешки фибробластни клетъчни линии (HEL, MRC5), **поддържани в среда с 10% FCS, 2 mM L-glutamine, без антибиотици**
- PCR за доказване на 16S rRNA-ген в биопсичен материал от сърдечна клапа или дуоденум или материал от изолитрана чиста култура

Legionella

- Инокулиране на кръв/клапен материал в бульонови среди за работа с автоматизирани системи (Bactec 9000, BacT/Alert) с **периодично субкултивирание върху BCYE-агар**
- Серологично изследване, особено след получаване на негативен резултат за Q-треска
- PCR

Chlamydia

- Серологично изследване по метода на антитяло-кръстосана абсорбция и West-ern-имуноблот
- Директно откриване на микроорганизма в клапен материал чрез имуно-хистохимичен метод с моноклонални антители
- Използване на заешки поликлонални антители с насоченост срещу *C. psittaci* за индиректно доказване на микроорганизма в кръв, инокулирана в клетъчна култура L929
- PCR

Coxiella

- Серологично изследване за доказване на антители срещу фаза 1 и 2 антигени. Имунофлуоресцентният метод е референтен и добре разграничава титрите на антителата от клас IgM, IgG и IgA. **Висока предсказателна стойност имат T/IgG => 800 и T/IgA => 100. IgM титрите могат да варират.**
- Доказване на микроорганизма от кръв/клапен материал чрез инокулиране в човешки фибробластни клетки след инкубация 6 дни. Инфектираните клетки се откриват чрез имунофлуоресценция с поликлонални заешки или моноклонални миши антители.
- Визуализиране на *C. burnetii* в клапен материал чрез имунохистохимичен метод
- PCR

НАСЕК-група

- Изследване на кръв за хемокултура при удължаване на времето за инкубация до

30 дни. Субкултурите се извършват върху кръвен и шоколадов агар с добавка на растежни фактори X (Hemin) и V (NAD). Петритата се инкубират в атмосфера с 5-10% CO₂ в продължение на 48-72 часа

- PCR за доказване на 16S rRNA-ген

Brucella

- Изследване на кръв за хемокултура при утължаване на времето за инкубация до 4-6 седмици. Използват се обогатени бульони, двуфазни среди (Ruiz-Castaneda), специални бульони за автоматизирани системи (Bactec NR, Bactec NR660, BacT/Alert), флакони за системата Isolator (лизис-центрофузиране). Правят се периодични субкултури върху кръвен, шоколадов и триптично-соев агар, като петритата се инкубират в атмосфера с 5-10% CO₂
- Серологично изследване за доказване титър на IgA, IgG и IgM антитела се извършва чрез имунофлуоресценция, ELISA, Western-blot. Референтен метод е аглутинацията (диагностичен титър > 1:160), въпреки наличието на кръстосани реакции между Brucella, Yersinia и Francisella.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Своевременната, коректно поставена етиологична диагноза е важен елемент в цялостния лечебно-диагностичен процес при пациентите с подозрение за ИЕ. Изолирането на патогена, определянето на неговата видова принадлежност и профил на антибиотична чувствителност са от есенциално значение за успешно овладяване на инфекцията. Когато културелното изследване е негативно, трябва да се направи опит за доказване на причинителя чрез некултурелни методи. В тези случаи е особено важно лекуващият лекар да потърси консултативна помощ от клиничната микробиологична лаборатория.