

Современные тренды этиологической диагностики инфекционного эндокардита

Котова Е.О.^{1*}, Домонова Э.А.², Кобалава Ж.Д.¹, Караулова Ю.Л.¹,
Писарюк А.С.^{1,3}, Балацкий А.В.⁴, Акимкин В.Г.²

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Россия

³ Городская клиническая больница им. В.В. Виноградова, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Успехи диагностики и лечения больных инфекционным эндокардитом ограничены высокой частотой случаев с неустановленной этиологией и несовершенством микробиологических (культуральных) методов, для преодоления которых были внедрены новые подходы к идентификации возбудителей инфекционного эндокардита, позволившие достичь определенных положительных результатов. Однако следует констатировать, что несмотря на все разнообразие диагностических приемов, используемых на сегодняшний момент, идеального метода этиологической лабораторной диагностики инфекционного эндокардита нет. В статье рассмотрены особенности и место иммунохимических, молекулярно-биологических (MALDI-TOF MS, ПЦР в режиме «реального времени», секвенирование, флуоресцентная гибридизация *in situ*, метагеномные методы и др.), иммуногистохимических исследований, определены преимущества и ограничения их применения.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит неустановленной этиологии, микробиологические методы, MALDI-TOF MS, ПЦР-РВ (Real-time), микробиологистика.

Для цитирования: Котова Е.О., Домонова Э.А., Кобалава Ж.Д., Караулова Ю.Л., Писарюк А.С., Балацкий А.В., Акимкин В.Г. Современные тренды этиологической диагностики инфекционного эндокардита. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии* 2021;17(1):153-164. DOI:10.20996/1819-6446-2021-02-14.

Modern trends in identification of causative agents in infective endocarditis

Kotova E.O.^{1*}, Domonova E.A.², Kobalava Zh.D.¹, Karaulova J.L.¹, Pisaryuk A.S.^{1,3}, Balatskiy A.V.⁴, Akimkin V.G.²

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, Russia

² Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

³ Moscow City Hospital named after V.V. Vinogradov, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Advances in the diagnosis and treatment of patients with infectious endocarditis are limited by the high frequency of cases with an unknown etiology and imperfection of microbiological (cultural) methods. To overcome these problems new approaches to the identification of infectious endocarditis pathogens were introduced, which allowed achieving certain positive results. However, it should be noted that despite the wide variety of diagnostic tools currently used, there is no ideal method for etiological laboratory diagnosis of infectious endocarditis. The article discusses the features and place of immunochemical, molecular biological (MALDI-TOF MS, real-time PCR, sequencing, *in situ* fluorescence hybridization, metagenomic methods, etc.), immunohistochemical methods, and their advantages and limitations.

Key words: culture negative infective endocarditis, microbiological methods, MALDI-TOF MS, Real-time PCR, microbiologic

For citation: Kotova E.O., Domonova E.A., Kobalava Zh.D., Karaulova J.L., Pisaryuk A.S., Balatskiy A.V., Akimkin V.G. Modern trends in identification of causative agents in infective endocarditis. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2021;17(1):153-164. DOI:10.20996/1819-6446-2021-02-14.

*Corresponding Author (Автор, ответственный за переписку): kotova_eo@pfur.ru

Введение

Эпидемиология современного инфекционного эндокардита (ИЭ) претерпела значительную трансформацию, связанную с изменением этиологической природы, профиля предшествующей клапанной патологии и формы приобретения заболевания. Микробиологическая структура ИЭ настоящего времени отличается преобладанием доли ИЭ, вызванного стафилококками (чаще всего *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные *Staphylococcus spp. CoNS*), уменьшением частоты

ИЭ, вызванного стрептококками, а также ростом встречаемости ИЭ, вызванного энтерококками, грамотрицательными бактериями (группа НАСЕК, *Enterobacteriaceae spp.*), грибами (преимущественно *Candida spp.*) и сохраняющейся высокой частотой ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования. Интересным оказалось наблюдение, что с годами не произошло ожидаемого снижения частоты ИЭ неустановленной этиологии: 2009 г. – 2,5-31% [10], 2013 г. – 68,3% [4], 2015 г. 56-63% [6], 2016 г. – 47,2 % (собственные данные), что вероятно обусловлено агрессивной тактикой ведения пациентов с ранним активным использованием анти-

Received/Поступила: 21.10.2020

Accepted/Принята в печать: 27.11.2020

бактериальной терапии (АБТ) и ограничениями микробиологических методов диагностики [1-5].

Среди причин предшествующей клапанной патологии отмечается рост встречаемости ИЭ на фоне дегенеративных пороков сердца, протезированных клапанов, имплантированных внутрисердечных устройств и ИЭ у лиц с внутривенным употреблением психоактивных веществ [1-3, 6]. Наибольшую тревогу вызывает увеличение частоты ИЭ, ассоциированного с оказанием медицинской помощи (до 30%) [1,6], этиологическая структура которого часто представлена *S. aureus* (преимущественно метициллинрезистентными *S. aureus* – MRSA), *CoNS*, энтерококками и не-HACEK грамотрицательными бактериями палочковидной формы, которые отличаются высокой резистентностью и определяют большую летальность среди этих пациентов [7]. Все выше сказанное влияет на рост частоты ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования крови.

Идентификация этиопатогенетического инфекционного агента имеет решающее значение для выбора стратегии оптимальной АБТ и, соответственно, определяет благоприятный прогноз у пациентов с ИЭ, в то время как несвоевременное получение или отсутствие данных об этиологии приводят к назначению неадекватной АБТ, способствуя росту антибиотикоустойчивых штаммов, токсичности, увеличению стоимости проводимого лечения и более длительному пребыванию в стационаре со снижением показателей выживаемости [8]. Японскими исследователями, наблюдавшими пациентов с ИЭ в 2008-2013 гг. продемонстрировано, что 62% больных до получения данных об этиологии заболевания получали неадекватную АБТ [9].

В настоящее время диагностика ИЭ основывается на модифицированных критериях Дюка [6], при этом идентификация возбудителя имеет определяющее значение и включена как в большие, так и в малые критерии. «Золотым стандартом» диагностики ИЭ являются гистопатологические критерии, включающие выявление этиологического агента в вегетациях (или пораженных структурах сердца) и гистологическое подтверждение активности ИЭ (клапаны, вегетации, эмболы и д.р.) [1, 6].

Ведущим проявлением ИЭ является бактериемия, отличающаяся транзиторным характером и невысокой концентрацией возбудителя в крови, что и определяет высокую частоту ИЭ с неустановленной этиологией. Основными методами идентификации этиологической причины ИЭ, применяющимися в современных лабораториях, являются: микробиологический, иммунохимический и молекулярно-биологический исследования (табл. 1). В предыдущих рекомендациях ЕОК по ведению больных с ИЭ от 2009 г. в качестве специального эффективного метода этиологической диаг-

ности ИЭ указана лишь полимеразная цепная реакция (ПЦР) [10], а в текущих рекомендациях 2015 г. [6] – обращено внимание на возможности MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией (суть метода подробно описана ниже) [6].

Исследование крови

Микробиологическое (культуральное) исследование крови на стерильность

Микробиологические исследования крови на стерильность основаны на выделении чистой культуры возбудителя и его дальнейшей идентификации на основании комплекса фенотипических свойств микроорганизма: морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических и антигенных признаков. Современные автоматизированные системы инкубирования и непрерывного мониторинга посевов крови (Microscan, Siemens Healthcare Diagnostics; BD Phoenix Automated Microbiology System; VITEK, bioMerieux) дают возможность идентифицировать большинство значимых возбудителей ИЭ [11]. Однако взятие крови на фоне АБТ, а также наличие трудно/некультивируемых микроорганизмов определяют высокую частоту ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования крови, встречающегося в 2-40% случаев, а по отдельным данным – до 71% [2-6, 10]. Для преодоления высокой частоты ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования крови разработан ряд высокоточных и чувствительных методик, которые включены в мультимодальную стратегию по оптимизации выявления этиологического агента при ИЭ, представленные иммунохимическими и молекулярно-биологическими исследованиями.

Иммунохимические исследования

Иммунохимическое исследование для определения спектра специфических антител (АТ) и их концентрации в плазме или сыворотке крови обследуемого традиционно входит в комплекс современной лабораторной диагностики ИЭ. Его результаты позволяют констатировать: факт инфицирования, длительность периода развития инфекционного процесса (на основании данных индекса avidности специфических АТ класса IgG) и в ряде наблюдений судить о форме и стадии заболевания (выявление маркеров первичной инфекции, реактивации и т.п.). Для обнаружения и количественного определения специфических АТ были предложены и прошли клиническую апробацию ряд методов/методик. В практической работе в настоящее время наиболее широко применимы методы с использованием меченых АТ и антигенов, например, иммунофермент-

Table 1. Comparative characteristics of methods of etiological diagnosis of infective endocarditis
Таблица 1. Сравнительная характеристика методов этиологической диагностики ИЭ

Метод	Преимущества	Недостатки
Микробиологические исследования (определение самого возбудителя в исследуемом материале)	• Высокая аналитическая чувствительность (10^2 м.к./мл) и специфичность. • Определение антибиотикочувствительности/резистентности. • Относительно низкая стоимость.	• Высокая зависимость от используемых питательных сред и условий культивирования. • Большая длительность проведения исследования (до 120 ч и более). • Высокие требования к взятию биологического материала. • Высокая частота отрицательных результатов исследования.
Иммунохимические исследования (определение специфических антител к антигенам возбудителя)	• Высокая аналитическая специфичность (приближается к 100%) и чувствительность (варьирует в зависимости от выбранной методики). • Быстрота проведения исследования (до 4 ч)	• Ложноположительные результаты, обусловленные наличием перекрестной реактивности (например, <i>Bartonella spp.</i>, <i>Chlamydia/Chlamydophila spp.</i>, и <i>Bartonella spp.</i> и <i>Coxiella spp.</i>). • Отсутствие возможности получения данных по антибиотикочувствительности/резистентности. • Ложноотрицательные результаты, связанные с наличием интерферирующих веществ и у пациентов с нарушениями иммунной системы.
Молекулярно-биологические методы: ПЦР (определение НК возбудителя)	• Очень высокая аналитическая специфичность и чувствительность (приближается к 100%). • Воспроизводимость результатов. • Идентификация трудно/некультивируемых микроорганизмов. • Быстрота выполнения исследования (от 2 до 6 ч).	• Ограниченный спектр (диапазон) выявляемых мишеней (этиопатогенетических агентов ИЭ), связанный с отсутствием разработанных методик и/или зарегистрированных наборов реагентов для детекции НК возбудителя. • Влияние интерферирующих веществ. • Затруднения при определении антибиотикочувствительности/резистентности, связанные с аналогичными причинами. • В ряде случаев – высокая стоимость оборудования и расходных материалов, необходимость специализированной лаборатории.
Молекулярно-биологические методы: MALDI-TOF MS (определение уникальных белковых спектров возбудителя)	• Высокая аналитическая специфичность (приближается к 100%) и чувствительность (при условии наличия качественной референтной базы). • Актуальная референтная база данных (по состоянию на 2019 г.): 2700 видов микроорганизмов. • Низкая стоимость эксплуатационных расходов.	• Исследование может быть выполнено только после получения первичной гемокультуры. • Спектральные помехи (при исследовании капсульных микроорганизмов, могут быть обусловлены типом питательной среды). • Невозможность дифференцировать сходные или близкородственные организмы (например, <i>Escherichia coli</i> и <i>Shigella spp.</i>, различные виды грибковой инфекции). • Существенные ограничения в идентификации полифлоры (не более двух микроорганизмов). • Трудности определения антибиотикочувствительности/резистентности. • Высокая стоимость оборудования. • Ограничения референтных баз данных.

м.к./мл – микробных клеток в миллилитре, ПЦР – полимеразная цепная реакция, НК – нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК), ИЭ – инфекционный эндокардит, MALDI-TOF MS – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией.

ный анализ (ИФА). Иные представители этой группы исследований [реакция агглютинации (РА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и иммунохроматографический анализ (ИХА)] практически не применяются [12]. Чувствительность методов составляет: РА – 10^8 - 10^9 микробных клеток (м.к.)/мл, РНГА – 10^8 м.к./мл, ИФА – 10^5 - 10^6 м.к./мл, ИХА – 2×10^5 - 2×10^6 м.к./мл, а специфичность ассоциирована с качеством применяемых антител и может достигать 100% [13,14]. Длительность выполнения исследования – от 20 мин (ИХА) до 2-4 ч (ИФА) [12].

Эффективность выявления специфических АТ подтверждена рядом исследований, по результатам которых тестирование сыворотки крови позволило дополнительно установить этиологический агент при ИЭ у 8% (34/425) пациентов [15], по другим данным – у 77% (268/348) [16]. В соответствии с рекомендациями ЕОК 2015 г. определение специфических АТ с использованием иммунохимических исследований показано в случае ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования крови, когда этиологическим агентом может быть представитель атипичной микрофлоры, в первую очередь: *Coxiella burnetii*,

Bartonella spp., *Brucella spp.*, а также *Tropheryma whippelii*, в некоторых случаях – *Mycoplasma spp.*, *Legionella spp.*, *Chlamydia/Chlamydophila spp.* и грибы [17]. Все перечисленные возбудители, кроме *Tropheryma whippelii*, могут выделяться микробиологическими исследованиями, но плохо и длительно растут на питательных средах, что часто приводит к ложноотрицательным результатам. Наиболее достоверные данные идентификации возбудителя ИЭ при обнаружении специфических АТ иммунохимическими методами продемонстрированы для *Coxiella burnetii* (большой критерий ИЭ IgG фазы I >1:800) [6,18]. В то время как для *Bartonella spp.*, которая часто диагностируется при тестировании сыворотки крови, отмечена перекрестная реактивность, в частности с *Chlamydia/Chlamydophila spp.*, что может приводить к ложноположительной диагностике хламидийного ИЭ [17], в связи с чем выполнять данное исследование для выявления крайне редких причин ИЭ (например, *Legionella spp.*, *Chlamydia/Chlamydophila spp.*) рекомендуется с осторожностью. Незначительная перекрестная реактивность при определении специфических АТ имеет место и между *Bartonella spp.* и *Coxiella spp.* Среди ограничений метода также следует отметить возможность выявления специфических АТ к антигенам возбудителей ранее перенесенных заболеваний (анамнестические АТ), не связанных с оцениваемым эпизодом ИЭ, и приводящих к ложноположительным результатам диагностики. Также следует отметить возможность получения ложноотрицательных результатов тестирования, обусловленных присутствием в образце исследуемого материала интерферирующих веществ (например, форменных элементов крови) или у пациентов с нарушениями иммунной системы.

Молекулярно-биологические исследования

В настоящее время молекулярно-биологические исследования включают: методы на основе масс-спектрометрического анализа, методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) и секвенирование.

Методы амплификации нуклеиновых кислот и секвенирование

Полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая обнаружить нуклеиновые кислоты (НК) патогена непосредственно в биологическом материале пациента, получила наиболее широкое распространение среди молекулярно-биологических исследований для диагностики ИЭ в конце XX в. – начале XXI в.

Тот факт, что у всех представителей царства бактерий присутствует ген 16S рРНК [19], а у царства грибов – 18S рРНК [20] позволяет решить целый ряд диагностических задач. Используя данную диагностическую мишень, можно точно определить генетическую при-

надлежность микроорганизмов, проводя расшифровку при помощи секвенирования. Данный подход включает в себя следующие этапы: экстракция НК из образцов биологического материала, постановка реакции амплификации с анализом полученных результатов, определение нуклеотидной последовательности фрагментов генетического материала – проведение секвенирования (наибольшее распространение получило секвенирование по Сенгеру), анализ полученных нуклеотидных последовательностей в сравнении с референтными нуклеотидными последовательностями, представленными в международных базах геномных данных (например: GenBank).

При этиологической диагностике ИЭ помимо ПЦР с видоспецифичными праймерами в формате моноплекс (выявление одной мишени – определенного вида возбудителя) или мультиплекс (две и более разнородных мишеней одновременно – несколько определенных видов возбудителей) используют ПЦР с родоспецифичными праймерами, направленную на выявление возбудителей, принадлежащих к более широкой генетической группе – роду (например: *Streptococcus spp.*) без возможности определения до вида в рамках проводимого исследования, так же в моноплексном или мультиплексном формате. В целом, показано, что использование мультиплексирования позволяет увеличить пропускную способность лаборатории, снизить временные затраты и себестоимость проведения ПЦР-исследования.

Видоспецифическая ПЦР в первую очередь применяется для выявления *C. burnetii*, *Bartonella spp.*, *T. whippelii*, *C. acnes* и *M. hominis*, как наиболее частых представителей труднокультивируемых микроорганизмов, но также и для других возможных возбудителей ИЭ. Родоспецифическая ПЦР, как правило, применяется для прямого поиска НК инфекционного агента в крови больного ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования крови.

Для диагностики ИЭ на основе МАНК и секвенирования применяют разные типы биологического материала (рис. 1): первичная гемокультура, колонии с плотных питательных сред, цельная кровь пациента (когда культивирование возбудителя исключается полностью) и тканевые образцы иссеченного сердечного клапана [6].

Согласно F. Korber и соавт., выполнившим ретроспективный анализ сравнения ПЦР (SeptiFast) и микробиологических методов идентификации возбудителя в крови у лихорадящих пациентов или пациентов с системными инфекциями, включая ИЭ, положительные результаты ПЦР-исследования определялись в 88/427 (20,6%) случаев, а положительные результаты микробиологического исследования крови – в 60/427 (14,0%), при этом положительный результат ПЦР при

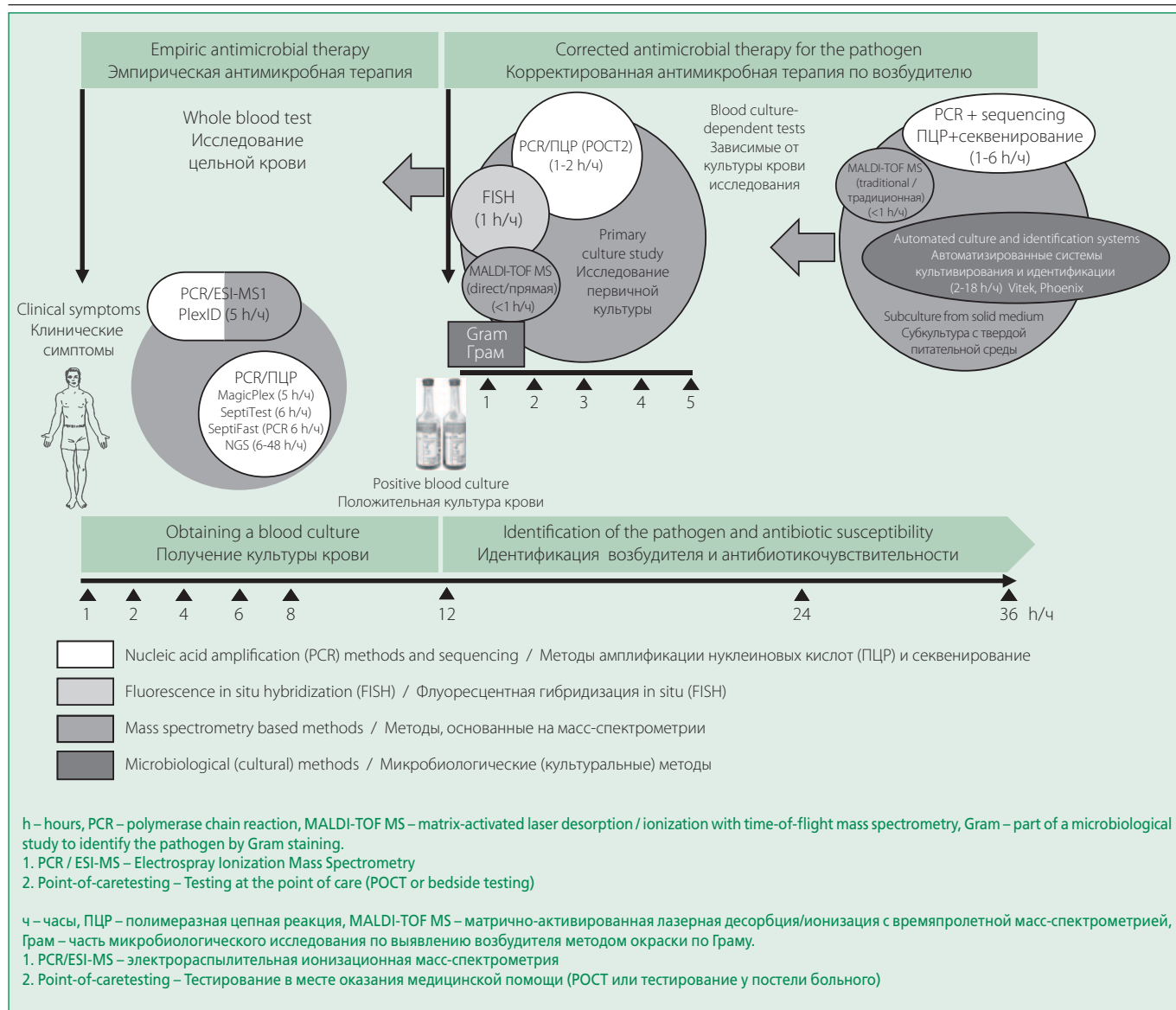


Figure 1. Time possibilities of using laboratory methods of etiological diagnosis of infective endocarditis

Рисунок 1. Временные возможности применения лабораторных методов этиологической диагностики ИЭ

отрицательном результате микробиологического исследования крови отмечался у 44 (10,3%) пациентов [8]. Результаты ПЦР-анализа и исследования культуры крови были сопоставимы в 365/427 (85,5%) случаях. Ложноотрицательные результаты ПЦР имелись у 16/427 (3,7%) и были связаны с отсутствием полученной последовательности НК в базе данных для ПЦР. Таким образом, всего обоими методами идентифицировано 120 этиопатогенетически значимых микроорганизмов, 81,7% – методом ПЦР, а 52,5% – при микробиологическом исследовании крови. Также показано, что у 276/427 (64,6%) пациентов находящихся на АБТ достоверно чаще НК возбудителя была идентифицирована методом ПЦР, что еще раз доказывает большую значимость молекулярно-биологических методов при ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования крови, ассоциирован-

ными с предшествующей АБТ [8,21-23]. Аналогичные данные получены нами (2016 г.) при проведении параллельного сравнительного анализа результатов микробиологического исследования крови и обнаружения НК возбудителя методом ПЦР с секвенированием для диагностики ИЭ у 53 больных, продемонстрировавшие, что микробиологическим методом удалось выявить возбудителя ИЭ у 28/53 (52,8%), ПЦР – у 34/53 (64,2%), а при совместном применении обоих методов – у 38/53 (71,7%). Совпадение результатов обоих исследований отмечено у 36/53 (67,9%) обследованных, в 7/53 (13,2%) случаях имелись discordantные результаты с положительными результатами микробиологического исследования крови, а у 10 (18,9%) пациентов получены положительные результаты выявления НК при отрицательных результатах микробиологического исследования крови [5]. С другой

стороны, в серии наблюдений было отмечено, что ПЦР при диагностике ИЭ обладает меньшей диагностической эффективностью, чем, например, при сепсисе или пневмонии, что объясняется следующими причинами: невысокая концентрация возбудителя в крови больных ИЭ; некоторые редкие возбудители ИЭ не всегда включены в панель для ПЦР-исследования, в связи с этим приобретает актуальность видоспецифическая ПЦР [1,24].

В настоящее время в лабораторную диагностику ИЭ внедрено множество модификаций метода с различными вариантами регистрации результатов реакции: ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом полученных результатов по «конечной точке» с возможностью качественного анализа накопленных продуктов ПЦР, автоматической регистрации и интерпретации полученных результатов; ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов анализа в режиме «реального времени» Real-time (определение специфической мишени, последовательности НК, в качественном или количественном формате проводится после каждого цикла амплификации) и др. [24,25]. Широко применяемые МАНК и секвенирование отличаются 100 % специфичностью и высокой чувствительностью ($1:10^2$ – $1:10^3$ м.к./мл.), быстротой выполнения анализа (до 2–3 ч) (рис. 1) [9,24,25]. Наряду с перечисленными преимуществами, они характеризуются некоторыми особенностями: возможностью ложноотрицательных результатов [спектр идентифицируемых патогенов часто ограничен отсутствием разработанных методик и/или зарегистрированных наборов реагентов, трудности проведения ПЦР у пациентов на АБТ (низкий уровень бактериемии) и/или влияние интерферирующих веществ (ингибиторы ПЦР, например, гепарин)] и ложноположительных результатов (идентификация НК этиопатогенетически не значимых возбудителей) [26].

Для преодоления получения ложноотрицательных результатов в первую очередь рекомендовано отдавать предпочтение видоспецифической ПЦР. При этом следует отметить, что концентрация возбудителя в ткани клапана значимо выше, чем в крови [13,27,28]. Было показано, что частота выявления *Bartonella spp.* при ПЦР-анализе тканевых образцов сердечного клапана составляет 92%, а в крови и сыворотке 33% и 36%, соответственно [29].

Обнаружение НК этиологически не значимых микроорганизмов является важной проблемой ложноположительных результатов ПЦР. Согласно проведенным исследованиям, в тканевых образцах иссеченных клапанов методом ПЦР были выявлены возбудители грибковой инфекции у 15/117 (13%) прооперированных, при этом у 8/15 (53%) пациентов данные микроорганизмы признаны этиопатогенетически не значи-

мыми в связи с отсутствием каких-либо клинических проявлений инфекции [30]. Аналогично в исследовании F. Korber с соавт. при идентификации возбудителя в крови методами ПЦР 34,7% (52/150) микроорганизмов относились к этиопатогенетически не значимым, в подавляющем большинстве представленные *CoNS*, вероятнее всего обусловленные контаминацией на разных этапах проведения исследования (преимущественно преаналитического) [8]. В ряде других исследований отмечены более низкие показатели встречаемости ложноположительных результатов ПЦР [31,32]. Все вышесказанное свидетельствует о необходимости поиска алгоритма для решения данной проблемы. Персистенция бактериальной ДНК при ИЭ в клапанах сердца после успешно проведенного полного курса АБТ может длиться нескольких лет. Так было показано, что положительные результаты ПЦР ткани клапана сердца имели место у 7/30 (23%) пациентов с анамнезом ИЭ, при этом гистологических данных за активный ИЭ не получено [33].

Среди новых направлений молекулярно-биологических методов следует отметить развитие секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS, высокопроизводительное секвенирование, массовое параллельное секвенирование) – общее название для ряда различных методов, позволяющих проводить одновременное определение последовательностей НК либо для очень большого количества коротких молекул ДНК (до нескольких миллионов последовательностей молекул около 450–550 пар оснований) – секвенирование второго поколения, либо для относительно небольшого количества очень длинных молекул (до нескольких десятков тысяч молекул длиной до 200 000 пар оснований) – секвенирование третьего поколения. В основу NGS второго поколения заложены два принципа – секвенирование посредством лигирования (SOLiD, Thermo Fisher Scientific; BGISEQ-500, BGI) и секвенирование путем синтеза (MiSeq, HiSeq, Illumina; IonTorrent PGM, Thermo Fisher Scientific и др.). Нанопоровое секвенирование (секвенирование третьего поколения) основано на «протаскивании» интактной молекулы ДНК через нанопоры, расположенные на поверхности липидной мембраны, заключенной в реакционную камеру (MinION, GridIONX5, PromethION и SmidgION), при этом стадии амплификации и химического мечения образца НК не проводятся [34].

В 2018 г. и 2019 г. J. Cheng с соавт. провели серию исследований по изучению возможности применения методов NGS для обнаружения этиопатогенетического возбудителя в тканевых образцах клапанов больных ИЭ. При этом продемонстрировано превосходство результатов исследования NGS по показателям чувствительности по сравнению с микробиологическими исследованиями крови, исследованием культуры клапана

и окрашиванием по Граму (97,6% против 46,2%, 17,1%, 51,4% соответственно) [24, 25]. Также продемонстрированы значимые преимущества NGS для выявления возбудителя ИЭ на фоне применения АБТ [33, 35]. Таким образом NGS могут предоставить клиницистам ценную информацию по этиологии, а также по антибактериальной чувствительности для лечения пациентов с ИЭ, однако требуется оптимизация протоколов обработки образцов, секвенирования и анализа биоинформатики [24,25]. Ограничения по определению антибиотикорезистентности связаны с невозможностью обнаружения аллельных вариантов генов антибиотикорезистентности; по этой же причине невозможно дать представление о механизме генетической устойчивости и даже если будет выявлен ген резистентности, на данный момент не представлены методы, позволяющие дать оценку степени экспрессии этого гена [24,25].

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) позволяет идентифицировать, установить место нахождения и подсчитать единичные микробные клетки, а также их кластеры [36,37]. Метод основан на том, что клетки гибридизуются с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами, комплементарными специфическим участкам гена 16S или 18S рПНК, после чего исследуются под микроскопом. Можно выбрать зонды, которые будут гибридизоваться со всеми группами бактерий, что может потребоваться для подсчета количества последних на единицу объема. А можно подбирать зонды таким образом, чтобы они были специфичны для какого-то конкретного таксона. Однако с помощью FISH бактерии не идентифицируют до вида, а определяют их принадлежность к более крупным таксонам (род, семейство) и само исследование проводится только после получения первичной гемокультуры. Для FISH метода определяющее значение имеет тщательный выбор зондов, основанный на качественном анализе геномных баз данных микроорганизмов (в особенности для некультивируемых представителей), позволяющий идентифицировать целевые группы с минимальной вероятностью получения ложноположительных результатов. Следует отметить, что эффективность гибридизации варьирует среди представителей разных родов возбудителей, что также может вызывать трудности диагностики и приводить к систематической ошибке в оценке структуры сообщества. Для увеличения точности и чувствительности исследования используют модификации метода, такие как CARD-FISH или RING-FISH.

Методы, основанные на масс-спектрометрическом анализе

Впервые возможность получения уникальных масс-спектрометрических характеристик белков бактерий,

соответствующих их родовой и видовой принадлежности, продемонстрирована в 1975 г. [38]. В конце 80-х годов XX в. разработана матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI), основанная на импульсном лазерном облучении исследуемого вещества, смешанного с матрицей (представляющей собой химическое соединение, чаще всего органическую кислоту), модификацией которой является матричная лазерная десорбционно/ионизационно времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS), в основе которой лежит анализ рибосомальных белков, являющихся константными в пределах вида микроорганизма и широко применяющаяся в настоящее время в клинической диагностике, позволяя идентифицировать микроорганизмы с точностью до рода и вида [12]. В Российской Федерации (РФ) MALDI-TOF MS в научно-практических и клиничко-диагностических лабораториях применяется с начала 2000-х гг., Американское управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) одобрило использование MALDI-TOF MS только в 2013 г. [39].

MALDI-TOF MS включает в себя следующие этапы исследования: положительный образец первичной гемокультуры при микробиологическом исследовании крови культивируют на твердой подложке, затем микробные колонии подвергают процессу экстракции с использованием этанола и муравьиной кислоты, переносят на специальный планшет (матрицу) и помещают в камеру устройства, где материал подвергается воздействию лазерного излучения. Матрица (слабая кислота) играет ключевую роль, поглощая энергию лазерного света. Под его влиянием происходит десорбция (неразрушающее испарение) и ионизация микробных белков. Затем ионизированные пептиды ускоряются в сильном электрическом поле и измеряется время их пролета. Основываясь на полученном распределении пептидов по молекулярной массе, заряду и времени пролета, система генерирует спектрометрические спектры («отпечатки пальцев» бактерий) и сравнивает их с эталонными спектрами из референтной базы данных, которая содержит данные нескольких тысяч микроорганизмов. Вся процедура длится 30-40 секунд (при пробоподготовке несколько минут). Однако следует помнить, что время, необходимое для получения биологического материала для исследования, то есть время первоначального культивирования, как указано выше, обычно составляет не менее 24 ч (рис. 1) [40]. Чувствительность метода MALDI-TOF MS составляет 10^3 - 10^6 м.к./мл [12], и зависит от концентрации исследуемого материала, а специфичность видовой идентификации достигает 97,6% [41]. Стоимость исследования MALDI-TOF MS – 17-32% от стоимости идентификации микробиологическими методами [12,41].

Для подтверждения высокой специфичности MALDI-TOF MS проведено множество исследований, при этом в качестве сравнения использовались микробиологические исследования, а в случае расхождения результатов «золотым стандартом» выступало обнаружение НК методом ПЦР. Показано, что для выявления неферментирующих грамотрицательных бактерий родовая чувствительность составила 94,3-100%, а видовая 82,5-97,5%, а для микробиологических исследований 83-93,2% и 75-87,5%, соответственно [42,43]. Аналогичные исследования проведены в отношении определения грамположительных кокков, при этом точность родовой идентификации для MALDI-TOF MS составила 98,8-100%, видовой 73,6-100%, для метода сравнения – 99,2-100% и 63,2-87,9%, соответственно [43]. При идентификации грибов в гемокультуре методом MALDI-TOF MS точность определения до рода составила 96%, до вида 85-97% [30,44]. Трудности лабораторной внутривидовой и внутривидовой дифференциации бактерий методом MALDI-TOF MS связаны с наличием общих биохимических свойств, морфологических, тинкториальных характеристик, присутствием родоспецифических и перекрестно реагирующих антигенов, в связи с чем для масс-спектрометрических методов большое значение имеет качественная база референтных данных масс-спектров. MALDI-TOF MS исследование также позволяет точно идентифицировать и труднокультивируемых возбудителей, в частности род *Brucella spp.* с родовой и видовой точностью до 100% и 99,3%, соответственно [45,46].

Как правило, объектом MALDI-TOF MS является образец чистой культуры микроорганизма, выращенной на твердой питательной среде (традиционная MALDI-TOF MS), однако имеются многочисленные данные, подтвердившие возможность прямого анализа первичной гемокультуры (взвесь микробных клеток, клеток крови и детрита в жидкой питательной среде) – прямая MALDI-TOF MS [47,48]. При сравнении методов прямой и традиционной MALDI-TOF MS с микробиологическими методами у пациентов с сепсисом полное совпадение результатов имелось в 53/62 (85,5%) случаях, в 7/62 (11,1%) референтными методами выявлено более одного вида микроорганизма, а MALDI-TOF MS определен только возбудитель в максимальной концентрации, при этом большинство случаев смешанной флоры были представлены *S. epidermidis* или *S. haemolyticus*, относящимися к нормальной микрофлоре кожи, что не позволяет исключить контаминацию на подготовительном этапе. В двух случаях MALDI-TOF MS идентифицирован возбудитель только до рода. Полученные данные также продемонстрировали очень высокую степень согласия прямой и традиционной MALDI-TOF MS (значение

каппы Коэна составило 0,94; 95% доверительный интервал (ДИ) [0,89-0,98], $p < 0,001$) и высокое качество полученных спектров с надежной видовой идентификацией (средний Score 2,14; 95% ДИ [2,09-2,18]), при этом качество идентификации не зависело от видовой принадлежности бактерий и грибов [49]. В России аналогичные положительные результаты были продемонстрированы Д.А. Поповым и др.: при прямой MALDI-TOF MS корректно определено до вида 153/201 (76,1%) образца, с высоким значением согласованности результатов традиционной и прямой MALDI-TOF MS (каппа Коэна 0,96; $p < 0,001$), при этом отмечено, что доля успешных идентификаций грамотрицательных бактерий была выше, чем грамположительных (85,4 и 69,1% соответственно; $p = 0,01$) [26], что полностью подтверждается N. Wüppenhorst [50], J. Mestas и соавт. [51], J. Monterio и соавт. [52]. Временные затраты на проведение прямой MALDI-TOF MS после получения первичной гемокультуры, включая пробоподготовку, составляют не более 1 ч, что при условии проведения локального микробиологического мониторинга может способствовать существенному повышению эффективности стартовой АБТ. Для сравнения идентификация возбудителя традиционной MALDI-TOF MS обычно занимает 16-18 ч, а микробиологическими методами – до 1-2 сут (рис. 1). Следует также отметить разработки по совместному использованию прямой MALDI-TOF MS и прямого определения чувствительности к антимикробным препаратам путем тестирования фильтрата первичной гемокультуры, что позволяет достичь уровня корректной идентификации в 94% случаев, а определения антибиотикограммы в 93,5% со средним временем получения окончательного результата 11,4 ч по сравнению с 56,3 ч при использовании только микробиологического исследования ($p < 0,001$) [53].

В настоящее время MALDI-TOF MS используется также для анализа отдельных биологических молекул (НК, эндогенных белков, липидов, полисахаридов, жирных кислот), имеющих диагностическое и/или патогенетическое значение [12]. Разработаны методические подходы, созданы и постоянно расширяются базы данных для выявления резистентности, а также факторов вирулентности, например, возможность дифференцирования метициллин-резистентных *S. aureus* (MRSA) и метициллин-чувствительных *S. aureus* (MSSA); определение резистентности к бета-лактамам, основанное на детекции деградации бета-лактамов антибиотиков [54,55].

В последние годы идет разработка и внедрение в практику метода, который бы объединил вышеописанные исследования – ПЦР с ионизацией путем распыления в электрическом поле и масс-спектрометрию (PCR/ESI-MS – электрораспылительная ионизационная масс-спектрометрия) [56].

Исследование ткани сердечного клапана

Иссеченные ткани клапана сердца должны подвергаться обязательному гистологическому (определяют признаки воспалительного процесса и скопление колоний микроорганизмов при микроскопии) и этиологическому исследованиям (идентификация возбудителя ИЭ аналогичными методами определения микроорганизмов в крови). Сочетание признаков активного воспалительного процесса с выявлением этиопатогенетических агентов свидетельствует об активном ИЭ. Выявление возбудителя в ткани клапана без признаков воспаления характеризуется как перенесенный ИЭ, так как элиминация микроорганизмов из ткани клапана происходит значительно позже [57]. Приоритетным исследованием для выявления возбудителя в ткани клапана является обнаружение НК микроорганизма (в особенности видоспецифическая ПЦР), обладающее высокой чувствительностью и специфичностью, с обязательной критической оценкой полученных результатов в соответствии с клиническими данными больного.

Заключение

В последние годы произошли существенные изменения в эпидемиологии современного ИЭ, связанные в первую очередь с увеличением частоты ИЭ протезированных клапанов, внутрисердечных устройств и нозокомиальных форм, ассоциированных с высокой частотой ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования крови. Эти перемены привели к необходимости совершенствования и поиска новых возможностей этиологической лабораторной диагностики. Несмотря на доступные современные, высокоточные способы выявления возбудителя ИЭ, диагностические потребности остаются не до конца удовлетворенными и идеального метода пока не разработано. Рассмотренные в статье подходы обладают как преимуществами, так и недостатками, в связи с чем выбор метода исследования напрямую зависит от поставленных диагностических задач.

Иммунохимические методы, применяемые для обнаружения специфических АТ, обладают достаточно высокой диагностической эффективностью, но имеется вероятность получения ложноположительных результатов (перекрестная реактивность для *Bartonella spp.* с *Chlamydia/Chlamydophila spp.*, реже с *Coxiella spp.* или наличие длительно сохраняющихся АТ к ранее перенесенным заболеваниям, не связанным с оцениваемым эпизодом ИЭ), ложнопотрицательных результатов (присутствие интерферирующих веществ, у пациентов с нарушениями иммунитета) и отсутствие возможности исследования на антибиотикочувствительность/резистентность.

Внедрение MALDI-TOF MS революционно изменило подход к рутинной идентификации микроорганизмов.

Этот метод отличают высокая производительность, эффективность и низкая цена. В настоящее время MALDI-TOF MS применяется как экспресс-метод для точного видового определения большинства возбудителей, сокращая сроки идентификации до 24-48 ч. Усовершенствование метода с целью определения резистентности возбудителей к антибиотикам, делает его особенно привлекательным для клинической практики, но эти исследования требуют дальнейшего развития. К ограничениям MALDI-TOF MS относится сложность идентификации ко-патогенов в культурах с более чем одним микроорганизмом, трудности внутривидовой и внутривидовой дифференциации, связанные с наличием общих свойств и перекрестно реагирующих антигенов, в связи с чем принципиальное значение приобретает наличие качественной базы данных референтных масс-спектров, особенности которой связаны с территориальной распространенностью выявляемых штаммов.

«Золотым стандартом» идентификации микроорганизмов являются молекулярно-биологические методы, основанные на МАНК и секвенировании, отличающиеся быстротой получения результата, высокими чувствительностью и специфичностью, приближающимися к 100%. В то же время недостатками метода являются высокая стоимость анализа, многостадийность проведения, строгие требования к оснащению лаборатории и качеству наборов реагентов, отсутствие возможности определения чувствительности к антибиотикам, вероятность получения ложнопотрицательных результатов (ограниченный перечень идентифицируемых патогенов, трудности проведения ПЦР у пациентов на АБТ и/или при наличии ингибиторов ПЦР) и ложноположительных (идентификация этиопатогенетически незначимых микроорганизмов). Для уменьшения частоты ложнопотрицательных результатов рекомендовано в первую очередь отдавать предпочтение видоспецифической ПЦР. Новые направления в развитии молекулярно-биологических методов диагностики (NGS, FISH) могут оказаться весьма перспективными, но требуют дальнейшего изучения по оптимизации протокола проведения.

Краеугольным камнем диагностики ИЭ остается исследование ткани самого пораженного клапана сердца. При этом наибольшее значение приобретает гистологическая оценка изменений, дополненная выявлением этиологического агента из ткани клапана. Наиболее оптимальными исследованиями для выявления возбудителя в ткани клапана являются молекулярно-биологические методы (ПЦР в количественном формате, секвенирование), обладающие высокой чувствительностью и специфичностью, с обязательным согласованием с клиническими данными и результатами гистологических исследований. Способность

обнаружения НК длительно персистирующих микроорганизмов в тканях резецированных клапанов сердца скорее относится к преимуществам молекулярно-биологического метода, позволяя устанавливать факт перенесенного ИЭ ретроспективно. Диагностика ИЭ с отрицательной культурой крови без возможности исследования ткани пораженного клапана, не является оптимальной.

Таким образом, несмотря на все разнообразие диагностических подходов, крайне важными остаются микробиологические исследования, набирают значимость методы, основанные на масс-спектрометрическом анализе. ПЦР, секвенирование и иммунохимические исследования относятся к дополнительным методам и применяются при ИЭ неустановленной этиологии и/или для диагностики сложных случаев ИЭ. Решающее значение в диагностике ИЭ имеет широкое внедрение исследования тканевого материала оперированных клапанов.

С учетом вышеизложенных данных и собственного опыта, основанного на длительном наблюдении большой группы пациентов с ИЭ (n=176) [58,59] современным и прагматичным представляется следующий алгоритм этиологической диагностики ИЭ:

1. Первый этап (после первичного контакта с пациентом с подозрением на ИЭ, до назначения эмпирической АБТ) – проведение качественного микробиологического исследования крови на стерильность, дополненного MALDI-TOF MS (позволяет в короткие сроки и с высокой точностью идентифицировать возбудителей, включая труднокультивируемых, в частности *Brucella spp.*). При идентификации возбудителя и определении антибиотикочувствительности/резистентности – коррекция проводимой АБТ на специфическую.
2. Второй этап необходим в случае получения отрицательных результатов микробиологического исследования крови на стерильность. Целесообразно

проведение дополнительных исследований для установления этиологии: иммунохимических (поиск АТ к антигенам возбудителя), ПЦР и секвенирование (определение НК микроорганизма). При идентификации возбудителя – коррекция проводимой АБТ на специфическую.

3. Третий этап необходим в случае выявления ИЭ с истинно отрицательными результатами исследования культуры крови. Для исключения небактериального тромбэндокардита целесообразно определение АТ к кардиолипину, бета-2-гликопротеину, ДНК, протеину свиньи у пациентов с биологическим протезом клапана сердца.

Таким образом, этиологическая диагностика ИЭ является сложным, постоянно совершенствующимся, многокомпонентным процессом, имеющая значение не только как точная идентификация возбудителя для выбора оптимальной АБТ, но и как определение эпидемиологии заболевания. Критически важным является создание системы микробиологии (контроль качества выполняемых лабораторных исследований по выявлению этиологического агента ИЭ) и поиск более совершенных алгоритмов диагностики.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю признательность и благодарность доктору биологических наук, профессору, ведущему научному сотруднику ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора М.Г. Твороговой за советы и ценные замечания при работе над данной статьей.

This paper has been supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Отношения и Деятельность: нет.

Relationships and Activities: none.

References / Литература

1. Habib G., Lancellotti P., Erba P., et al., EURO-ENDO Investigators. Clinical presentation, aetiology and outcome of infective endocarditis. Results of the ESC-EORP EURO-ENDO (European infective endocarditis) registry: a prospective cohort study. *Eur Heart J.* 2019;40(39):3222-32. DOI:10.1093/eurheartj/ehz620.
2. Murdoch D., Corey G., Hoen B., et. all. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort study. *Arch Intern Med.* 2009;169:463-73. DOI:10.1001/archinternmed.2008.603.
3. Shevchenko Yu.L., ed. Infective endocarditis, manual. Moscow: Geotar-Media; 2012 (In Russ.) [Шевченко Ю.Л., ред. Инфекционные эндокардиты, руководство. М.: Гэотар-Медиа; 2012].
4. Danilov A.I., Alekseeva I.V., Asner T.V., et al. Real practice of therapy of infective endocarditis in the Russian Federation: intermediate results of the MAESTRO study. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2013;15(2); suppl 1:18-9 (In Russ.) [Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В. и др. Реальная практика терапии инфекционного эндокардита в РФ: промежуточные результаты исследования МАЭСТРО. Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. 2013;15(2); приложение 1:18-9].
5. Kotova E.O., Domonova E.A., Karaulova Yu.L., et al. Infective endocarditis: Importance of molecular biology techniques in the etiological diagnosis. *Ter Arkhiv.* 2016;88(11):62-7 (In Russ.) [Котова Е.О., Домонова Э.А., Караулова Ю.Л., и др. Инфекционный эндокардит: значение молекулярно-биологических методов в этиологической диагностике. Тер. Архив. 2016;88(11):62-7]. DOI:10.17116/terarkh2016881162-67.
6. Habib G., Lancellotti P., Antunes MJ., 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;36:3075-128. DOI:10.1093/eurheartj/ehv319.
7. Morpeth S., Murdoch D., Cabell C., et al. Non-HACEK gram-negative bacillus endocarditis. *Ann Intern Med.* 2007;147:829-35. DOI:10.7326/0003-4819-147-12-200712180-00002.
8. Korber F., Zeller M., Grünstäudl B., et al. SeptiFast versus blood culture in clinical routine – A report on 3 years experience. *Wien Klin Wochenschr.* 2017;129:427-34. DOI:10.1007/s00508-017-1181-3.

9. Fukuchi T, Iwata K., Ohji G. Failure of early diagnosis of infective endocarditis in Japan - a retrospective descriptive analysis. *Medicine* (Baltimore). 2014;93:237. DOI:10.1097/MD.0000000000000237
10. Habib G., Hoen B., Tornos P., Thuny F., 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;30:2369-413. DOI:10.1093/eurheartj/ehp285
11. Liesman R., Pitt B., Maleszewski J., Patel R. Laboratory diagnosis of infective endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2017;55:259-2608. DOI:10.1128/JCM.00635-17.
12. Spicyn A.N., Utkin D.V., Kuklev V.E., et al. Application of MALDI mass spectrometry in the diagnosis of especially dangerous infectious diseases: current state and prospects. *Problems of Especially Dangerous Infections*. 2014; 3:77-82 (In Russ.) [Спицын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., и др. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике особо опасных инфекционных болезней: современное состояние и перспективы. *Проблемы Особо Опасных Инфекций*. 2014;3:77-82]. DOI:10.21055/0370-1069-2014-3-77-82.
13. Lim D., Simpson J., Kearns E., Kramer M. Current and Developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and bio warfare. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(4):583-607. DOI:10.1128/CMR.18.4.583-607.2005.
14. Peruski A.H., Peruski L.F.Jr. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(4):506-13. DOI:10.1128/cdli.10.4.506-513.2003.
15. Raoult D., Casalta J., Richet H., et al. Contribution of systematic serological testing in diagnosis of infective endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5238-42. DOI:10.1128/JCM.43.10.5238-5242.2005.
16. Houpihan P., Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine* (Baltimore). 2005;84:162-73. DOI:10.1097/01.md.0000165658.82869.17.
17. Maurin M., Eb F., Etienne J., Raoult D. Serological cross-reactions between Bartonella and Chlamydia species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2283-7. DOI:10.1128/jcm.35.9.2283-2287.1997.
18. Baddour L., Wilson W., Bayer A., et al. Infective endocarditis in adults: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;132:1435-86. DOI:10.1161/CIR.0000000000000296.
19. Jenkins C., Ling L.C., Ciesielczuk H.L., 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;61:483-8. DOI:10.1099/jmm.0.030387-0.
20. Tattevin P., Revet M., Lefort A., Michelet C., Lortholary O. Fungal endocarditis: current challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44:290-4. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2014.07.003.
21. Mongelli G., Romeo M. A., Denaro C., et al. Added value of multi-pathogen probe based real-time PCR SeptiFast in the rapid diagnosis of bloodstream infections in patients with bacteraemia. *J Med Microbiol*. 2015;64(7):670-5. DOI:10.1099/jmm.0.000074.
22. Suberviola B., Márquez-López A., Castellanos-Ortega A., et al. Microbiological diagnosis of sepsis: polymerase chain reaction system versus blood cultures. *Am J Crit Care*. 2016;25(1):68-75. DOI:10.4037/ajcc2016728.
23. Casalta J., Gourié F., Roux V., et al. Evaluation of the Light Cycler Septi Fast test in the rapid etiologic diagnosis of infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(6):569-73. DOI:10.1007/s10096-008-0672-6.
24. Shrestha N., Ledtke C., Wang H., et al. Heart valve culture and sequencing to identify the infective endocarditis pathogen in surgically treated patients. *Ann Thorac Surg*. 2015;99:33-7. DOI:10.1016/j.athoracsurg.2014.07.028.
24. Cheng J., Hu H., Kang Y., et al. Identification of pathogens in culture-negative infective endocarditis cases by metagenomic analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2018;17(1):43. DOI:10.1186/s12941-018-0294-5.
25. Cheng J., Hu H., Fang W., et al. Detection of pathogens from resected heart valves of patients with infective endocarditis by next-generation sequencing. *Int J Infect Dis*. 2019;83:148-53. DOI:10.1016/j.ijid.2019.03.007.
26. Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Ju. Express-identification of positive blood cultures using the direct MALDI-TOF mass spectrometry method. *Anesthesiology and Reanimatology*. 2015;60(5):71-5 (In Russ.) [Попов Д.А., Овсенко С.Т., Вострикова Т.Ю. Экспресс – идентификация положительных гемокультур с помощью метода прямой MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Анестезиология и Реаниматология*. 2015;60(5):71-5].
27. Maneg D., Sponsel J., Muller I., et al. Advantages and limitations of direct PCR amplification of bacterial 16S-rDNA from resected heart tissue or swabs followed by direct sequencing for diagnosing infective endocarditis: a retrospective analysis in the routine clinical setting. *BioMed Res Int*. 2016;2016:e7923874. DOI:10.1155/2016/7923874.
28. Harris K., Yam T., Jalili S., et al. 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. DOI:10.1007/s10096-014-2145-4.
29. Edouard S., Nabet C., Lepidi H., et al. Bartonella, a common cause of endocarditis: a report on 106 cases and review. *J Clin Microbiol*. 2015;53:824-9. DOI:10.1128/JCM.02827-14.
30. Varani S., et al. Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J Infect*. 2009;58(5):346-51. DOI:10.1016/j.jinf.2009.03.001.
31. Tsalik E., Jones D., Nicholson B., et al. Multiplex PCR to diagnose blood stream infections in patients admitted from the emergency department with sepsis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):26-33. DOI:10.1128/JCM.01447-09.
32. Rovey 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. DOI:10.1128/JCM.43.1.163-167.2005.
33. Imai A., Gotoh K., Asano Y., et al. Comprehensive metagenomic approach for detecting causative microorganisms in culture-negative infective endocarditis. *Int J Cardiol*. 2014;172:288-9. DOI:10.1016/j.ijcard.2013.12.197.
34. Speranskaya A.S. Sequencing Next Gen. Molecular diagnostics of infectious diseases. In: Pokrovsky V.I., Vorogova M.G., Shipulina G.A., eds. Moscow: RIPOЛ classic; 2018: 145-71 (In Russ.) [Сперанская А.С. Секвенирование NextGen. Молекулярная диагностика инфекционных болезней. В: Покровский В.И., Творогова М.Г., Шипулин Г.А., ред. Молекулярная диагностика инфекционных болезней М.: РИПОЛ классик; 2018: 145-71].
35. Fukui Y., Aoki K., Okuma S., et al. Metagenomic analysis for detecting pathogens in culture-negative infective endocarditis. *J Infect Chemother*. 2015;21:882-4. DOI:10.1016/j.jiac.2015.08.007.
36. Costabile A., Santarelli S., Claus S.P., et al. Effect of breadmaking process on in vitro gut microbiota parameters in irritable bowel syndrome. *PLoS One*. 2014;9(10):e111225. DOI:10.1371/journal.pone.0111225.
37. Bruzzese E., Callegari M.L., Raia V., et al. Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with Lactobacillus GG: a randomised clinical trial. *PLoS One*. 2014;9(2):e87796. DOI:10.1371/journal.pone.0087796.
38. Barancevich E.P., Barancevich N.E. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Translational Medicine*. 2014;(3):23-8 (In Russ.) [Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии в клинической микробиологии. *Трансляционная Медицина*. 2014;(3):23-8]. DOI:10.18705/2311-4495-2014-0-3-23-28.
39. Malek-Elkowska M., Elikowski W., Lisiecka M., Szyszka A. 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. *Przegl Lek*. 2016;73(7):525-9.
40. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;36:380-407. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
41. Bader O., Weig M., Tavernier-Ghadwal L., et al. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17:1359-65. DOI:10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x.
42. Kosikowska U., Stępień-Pysiński D., Pietas-Ozga D., et al. Application of MALDI-TOF MS mass spectrometry in the identification of bacteria isolated from clinical materials from humans and animals. *Diagn Lab*. 2015;51:23-30 (In Russ.) [Kosikowska U., Stępień-Pysiński D., Pietas-Ozga D., Andrzejczuk S., Juda M. Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF MS w identyfikacji bakterii izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zwierząt. *Diagn Lab*. 2015;51:23-30].
43. De Carolis E., Vella A., Vaccaro L., et al. Development and Validation of an In-House Database for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Yeast Identification Using a Fast Protein Extraction Procedure. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1453-8. DOI:10.1128/JCM.03355-13.
44. Patel R. MALDI-TOF Mass Spectrometry: Transformative Proteomics for Clinical Microbiology. *Clin Chem*. 2013;59(2): 340-2. DOI:10.1373/jclinchem.2012.183558.
45. Ferreira L., Vega Castañón S.V., Sánchez-Juanes F., et al. Identification of Brucella by MALDI-TOF Mass Spectrometry: Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. *PLoS One*. 2010;5(12):14235. DOI:10.1371/journal.pone.0014235.
46. Lista F., Reubsaet F., De Santis R., et al. Reliable identification at the species level of Brucella isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiol*. 2011;11:267. DOI:10.1186/1471-2180-11-267.
47. Prod'hom G., Bizzini A., Durussel C., et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1481-3. DOI:10.1128/JCM.01780-09.
48. Ferreira L., Sánchez-Juanes F., González-Avila M., et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48(6):2110-5. DOI:10.1128/JCM.02215-09.
49. Lominadze G.G., Semenova E.A., Motuzova O.V., et al. Using the MALDI-TOF mass spectrometry method to determine the identification of microorganisms in blood cultures of patients with suspected sepsis. *Laboratory LPU*. 2014;4:17-20 (In Russ.) [Ломинадзе Г.Г., Семенова Е.А., Мотузова О.В., и др. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис. *Лаборатория ЛПУ*. 2014;4:17-20].
50. Wüppenhorst N., Consoir C., Lörch D., Schneider C. Direct identification of bacteria from charcoal-containing blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin. Microbiol Infect Dis*. 2012;31(10):2843-50. DOI:10.1007/s10096-012-1638-2.
51. Mestas J., Felsenstein S., Bard J.D. Direct identification of bacteria from positive BacT/ALERT blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;80(3):193-6. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2014.07.008.
52. Monteiro J., Inoue F.M., Lobo A.P., et al. Fast and reliable bacterial identification direct from positive blood culture using a new TFA sample preparation protocol and the Vitek MS system. *J Microbiol. Meth*. 2015;109:157-9. DOI:10.1016/j.mimet.2014.12.009.
53. Machen A., Drake T., Wang Y. Same Day Identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from Positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. *PLoS One*. 2014;9(2):e87870. DOI:10.1371/journal.pone.0087870.
54. Hooff G.P., van Kampen J.J., Meesters R.J., et al. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2012;11:79-84. DOI:10.1021/pr200858r.

55. Kostrzewa M., Sparbier K., Maier T., Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteom Clin.* 2013;7(11-12):767-78. DOI:10.1002/prca.201300042.
56. Wallet F., Herwegh S., Decoene C., Courcol R.J. 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;76:125-8. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.007.
57. Morris A.J., Drinkovic D., Pottumarthy S., et al. Gram stain, culture, and histopathological examination findings for heart valves removed because of infective endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2003;36:697-704. DOI:10.1086/367842.
58. Moiseev V.S., Kobalava Z.D., Pisaryuk A.S., et al. Infective Endocarditis in Moscow General Hospital: Clinical Characteristics and Outcomes (Single-Center 7 Years' Experience). *Kardiologiya.* 2018;58(12):62-5 (In Russ.). [Моисеев В.С., Кобалава Ж.Д. Мильто А.С., и др. Инфекционный эндокардит: клиническая характеристика и исходы (7-летний опыт лечения и наблюдения в многопрофильной городской больнице). *Кардиология.* 2018;58(12):62-5]. DOI:10.18087/cardio.2018.12.10192.
59. Habib G., Lancellotti P., Erba PA. et al., EURO-ENDO Investigators. The ESC-EORP EURO-ENDO (European Infective Endocarditis) registry. *European Heart Journal – Quality of Care and Clinical Outcomes* 2019;5(3):202-7. DOI:10.1093/ehjqcco/qcz018.

About the Authors / Информация об авторах

Котова Елизавета Олеговна [Elizaveta O. Kotova]
eLibrary SPIN 6397-6480, ORCID 0000-0002-9643-5089.
Домонова Эльвира Алексеевна [Elvira A. Domonova]
eLibrary SPIN 1781-8807, ORCID 0000-0001-8262-3938
Кобалава Жанна Давидовна [Zhanna D. Kobalava]
eLibrary SPIN 9828-5409, ORCID 0000-0002-5873-1768
Караулова Юлия Леонидовна [Yuliya L. Karaulova]
eLibrary SPIN 8967-1163, ORCID 0000-0003-4799-2740

Писарюк Александра Сергеевна [Alexandra S. Pisaryuk]
eLibrary SPIN 5602-1059, ORCID 0000-0003-4103-4322
Балацкий Александр Владимирович [Alexander V. Balatsky]
eLibrary SPIN 3106-1840, ORCID 0000-0002-6694-2231
Акимкин Василий Геннадьевич [Vasily G. Akimkin]
eLibrary SPIN 4038-7455, ORCID 0000-0003-4228-9044