

A petri dish containing a bacterial culture on a white agar surface. The culture shows several distinct colonies of varying sizes and shapes, some appearing as small dots and others as larger, more complex structures. The background is a light blue gradient.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA ENDOCARDITIS INFECCIOSA

Mercedes Marín
Serv. Microbiología Clínica-Enf. Infecciosas



XV Reunión GEIH. Madrid

Importancia del diagnóstico microbiológico en EI

- Enfermedad grave
- Elevada morbi-mortalidad
- Necesidad de tratamiento antibiótico temprano y optimizado
- Causada por diferentes microorganismos
- Etiología variable según tipo de válvula, factores de riesgo, etc.
- EI con cultivos negativos: mayor mortalidad y complicaciones*



* Houpikian *et al* (2003). *Cardiol Clin*

Criterios de Duke: papel del Dx. microbiológico

Criterios de Duke (Durack, 1994 Am J Med)	Modificaciones Propuestas
Criterios Patológicos	<p>1.- Microorganismos demostrados por cultivo o examen histológico de vegetación, vegetación que ha embolizado o absceso perivalvular</p> <p>2.- Endocarditis infecciosa activa demostrada por examen histológico</p>
Criterios Mayores	<p>1.- Hemocultivos positivos</p> <p>a) Microorganismos que causan típicamente EI, en 2 hemocultivos separados (<i>S.bovis</i>, <i>S. viridans</i>, HACEK)</p> <p>b) Hemocultivos persistentemente positivos:</p> <p>I.- 2 sets de hemocultivos extraídos con una separación > 12h</p> <p>II.- 3/3 positivos o la mayoría de 4 o más sets diferentes, siempre que el primero y el último estén separados al menos 1 h</p> <p>2.- Evidencia de afectación endocárdica</p> <p>a) Ecocardiograma positivo Vegetación en válvula o estructuras adyacentes Nueva dehiscencia parcial en válvula protésica Absceso</p> <p>b) Nueva regurgitación valvular</p>
Criterios Menores	<p>1.- Enfermedad cardíaca predisponente o ADVP</p> <p>2.- Fiebre >38°C</p> <p>3.- Fenómenos vasculares</p> <p>4.- Fenómenos inmunológicos</p> <p>5.- Ecocardiograma sugestivo de EI, no incluido en criterios mayores</p> <p>6.- Evidencia microbiológica de EI, no incluida en criterios mayores</p>



Hemocultivo + para *S. aureus* o *Enterococcus sp.* adquiridos en la comunidad en ausencia de foco primario ¹

Serología positiva para *Coxiella burnetti* ¹
IgG FI >1/800. Hemocultivos +

Serología positiva para *Bartonella spp.* o *Chlamydia psittaci* ²

PCR universal positiva para bacterias u hongos ³⁻⁴

PCR's específicas positivas ³⁻⁴

1.- Li y cols.; 2.- Lamas y cols; 3.- Millar y cols. 4.- Bosshard y cols

Criterios de Duke: papel del Dx. microbiológico

Categorías Diagnósticas	
El Definitiva	<p>1.- Criterios patológicos positivos</p> <p>2.- Criterios clínico-microbiológicos positivos:</p> <p>2 criterios Mayores 1 criterio Mayor y 3 menores 5 criterios menores</p>
El posible	<p>1 criterio Mayor y 1 menor positivos¹ 3 criterios menores positivos¹</p>
El Rechazada o descartada	<p>1.- Diagnóstico distinto que justifique los hallazgos</p> <p>2.- Resolución de las manifestaciones clínicas con 4 días de tratamiento antibiótico o menos</p> <p>3.- Sin evidencia histológica de EI en cirugía o necropsia</p>

Etiología

Clinical Presentation, Etiology, and Outcome of Infective Endocarditis in the 21st Century

The International Collaboration on Endocarditis—Prospective Cohort Study

David R. Murdoch, ARCH INTERN MED/VOL 169 (NO. 5), MAR 9, 2009

Table 5. Microbiologic Etiology by IE Type in 2781 Patients With Definite Endocarditis

Cause of Endocarditis	No. (%) of Patients ^a			
	Native Valve IE		Intracardiac Device IE	
	Drug Abusers (n=237)	Not Drug Abusers (n=1644)	PVIE (n=563)	Other Devices (n=172) ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	160 (68)	457 (28)	129 (23)	60 (35)
Coagulase-negative staphylococcus	7 (3)	148 (9)	95 (17)	45 (26)
Viridans group streptococci	24 (10)	345 (21)	70 (12)	14 (8)
<i>Streptococcus bovis</i>	3 (1)	119 (7)	29 (5)	5 (3)
Other streptococci	5 (2)	118 (7)	26 (5)	7 (4)
<i>Enterococcus</i> species	11 (5)	179 (11)	70 (12)	10 (6)
HACEK	0 (0)	30 (2)	13 (2)	1 (0.5)
Fungi/yeast	3 (1)	16 (1)	23 (4)	2 (1)
Polymicrobial	6 (3)	16 (1)	5 (0.8)	0 (0)
Negative culture findings	12 (5)	154 (9)	65 (12)	18 (11)
Other	6 (3)	62 (4)	38 (7)	10 (6)
Surgical therapy	89/234 (38) ^c	784/1639 (48)	274/561 (49)	104/172 (61)
In-hospital mortality	23/236 (10) ^c	281/1643 (17)	131/561 (23)	17/172 (10)

16%

El sobre válvulas protésicas

TABLA 1. Etiología de la endocarditis infecciosa en adultos sobre válvula protésica

	Estudio	Válvula protésica			
		ICE ^a		Barcelona ^b	
		Precoz ^d	Tardía ^d	Precoz	Tardía
Número de episodios		53	331	106	162
Estafilococos					
<i>Staphylococcus aureus</i>		36%	18%	20%	15%
Coagulasa negativos		17%	20%	50%	11%
Estreptococos					
Grupo viridans		2%	10%	4%	24%
<i>Streptococcus bovis</i>		2%	7%	–	4%
Neumococo		–	1%	–	1%
<i>Streptococcus agalactiae</i>		–	1%	2%	1%
Otros		–	3%	2%	3%
Enterococo		8%	13%	5%	15%
Grupo HACEK		–	2%	< 1%	5%
Fiebre Q		–	–	–	< 1%
Otros microorganismos		9%	8%	8%	3%
Hongos		9%	3%	2%	< 1%
Polimicrobiana		–	2%	< 1%	2%
Cultivo negativo		17%	12%	7%	14%

Almirante B y Miró JM. Infecciones asociadas a las válvulas protésicas cardíacas

Enferm Infecc Microbiol Clin 2008;26(10):647-64

El con Hemocultivos negativos

2,5-31% HC-
del total de El



ICE (2000-2002)
117 episodios (12%)

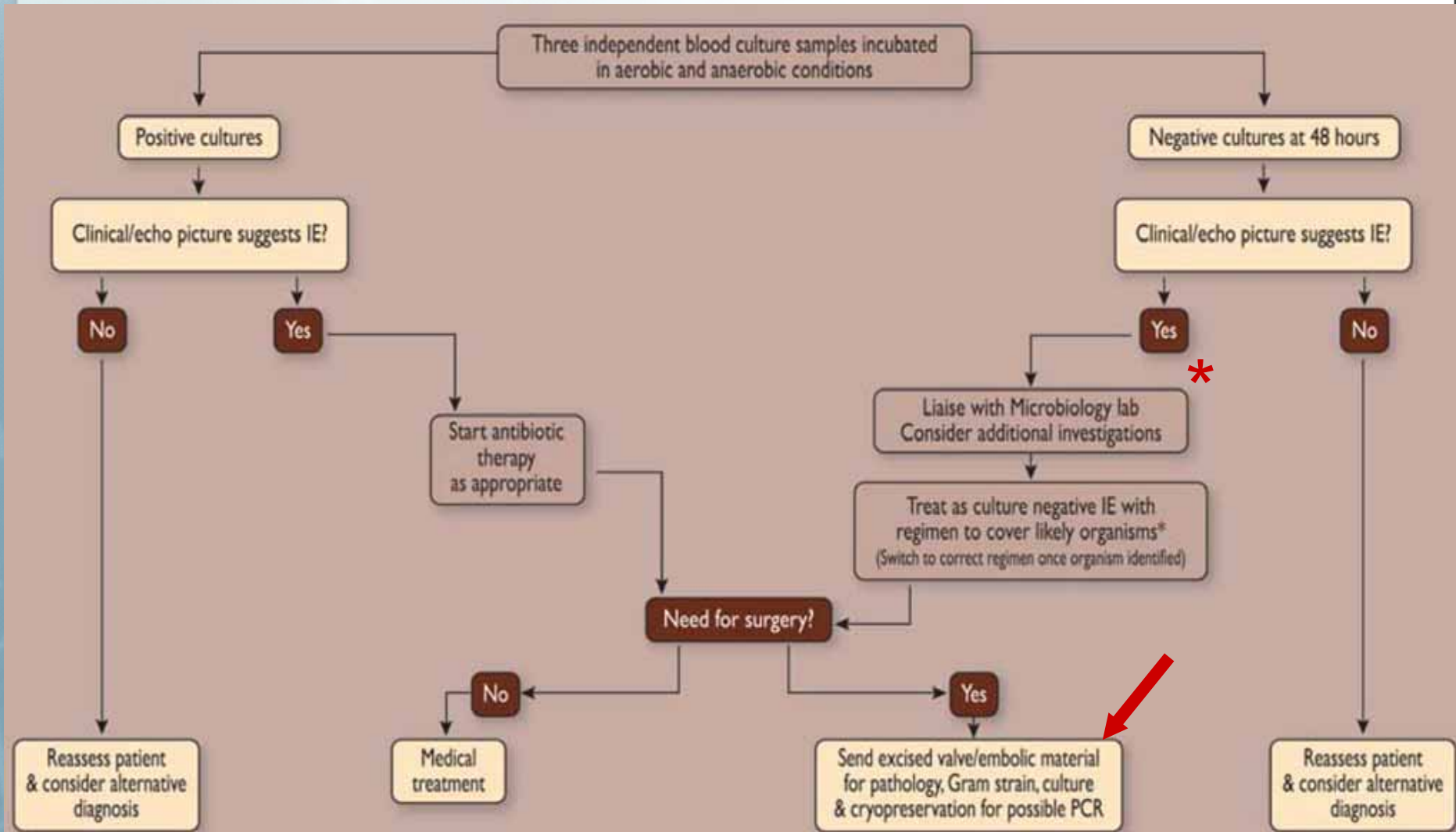
	n°	%
Antibióticos previos	54	46%
<i>Coxiella burnetii</i>	15	13%
<i>Brucella</i> spp.	14	12%
HACEK	13	11%
<i>Bartonella</i> spp.	10	8%
<i>Legionella</i> spp.	7	6%
<i>Aspergillus</i> spp.	2	2%
Otros	2	2%

Tto antibiótico previo

Microorganismos "exigentes"
o de cultivo difícil

Métodos microbiológicos
inadecuados

Diagnóstico microbiológico de EI



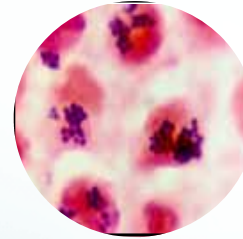
*Serología. Lisis-centrifugación
Enviar centro de referencia sangre periférica

EI guidelines. Eur. Heart J 2009

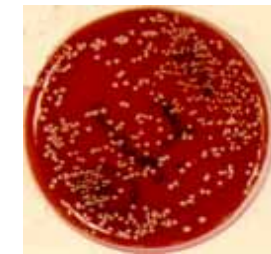
Métodos microbiológicos para el Diagnóstico de EI



- ✓ HC
- ✓ Serología
- ✓ Cultivo valvular
- ✓ T. Gram



- ✓ Métodos moleculares



Válvula cardíaca

Sangre periférica

Hemocultivos



Hemocultivos

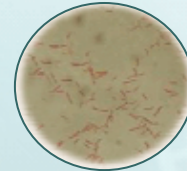
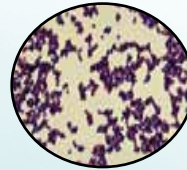
≈90% del diagnóstico etiológico de EI

HC +

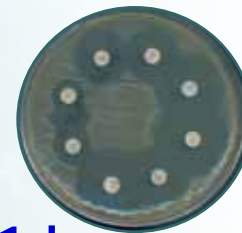


~7h-5d

T. Gram



Cultivo y
antibiograma "previo"



+ 1d

Identificación
y sensibilidad



+1-2d

G- 8,8h ; G+ 11 h



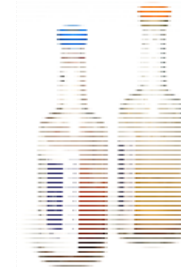
Hemocultivos



European Heart Journal (2009) 30, 2369–2413
doi:10.1093/eurheartj/ehg285

ESC GUIDELINES

Guidelines on the prevention, diagnosis,
and treatment of infective endocarditis
(new version 2009)



- Necesarias 3 extracciones
- Volúmen de sangre: 20 ml set (aerobio y anaerobio)
- Tiempo de incubación 5-7 días
- No extraer por catéter
- >Tiempo de incubación = >contaminantes
- No necesario extraer en periodo febril

Prolonged Incubation and Extensive
Subculturing Do Not Increase
Recovery of Clinically Significant
Microorganisms from Standard
Automated Blood Cultures

Ellen Jo Baron,^{1,2} John D. Scott,³ and Lucy S. Tompkins^{1,2}

CID 2005:41 (1 December)



1



2



3

se pierden 28 episodios (18.6%)*

*Rodriguez -Creixems et al ICAAC 1999

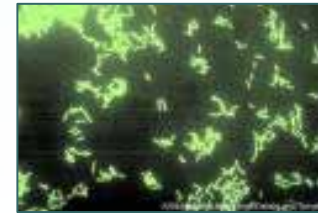
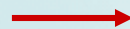
Utilidad de la Serología

Disponibile



Coxiella burnetii
Brucella melitensis
Bartonella spp.

Legionella pneumophila
Mycoplasma pneumoniae
Chlamydia spp.
Aspergillus spp.



1^{er} paso dx. etiológico
en EI con HC-



- ✓ EI es infección crónica
- ✓ Alto nivel de anticuerpos
- ✓ Suficiente 1 suero

Importante conocer
contexto epidemiológico

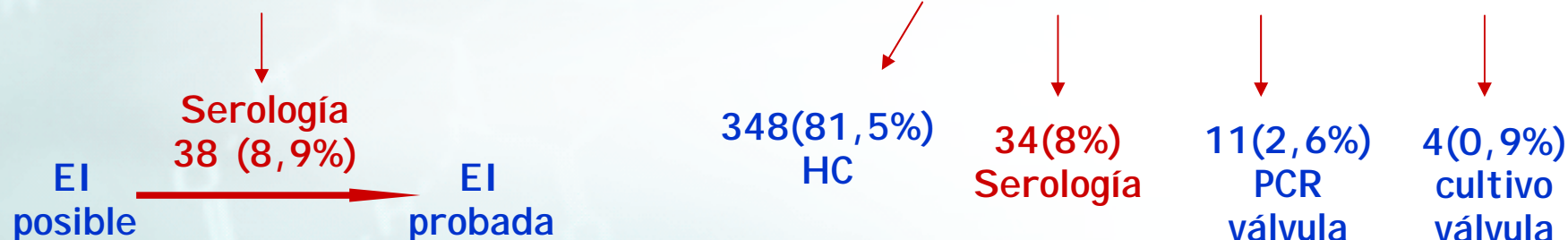
Realizar serología sin esperar
resultado de HC (*)

(*) Raoult y cols. (2005) *JCM*

Contribution of Systematic Serological Testing in Diagnosis of Infective Endocarditis

D. Raoult,^{1*} J. P. Casalta,¹ H. Richet,¹ M. Khan,¹ E. Bernit,¹ C. Roveery,¹ S. Branger,¹

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2005, p. 5238-5242



Test serológicos para diagnóstico de EI con HC- Houpikian & Raoult. (2003) <i>Cardiology Clinics</i> (21): 207-217			
Microorganismo	Técnica	Punto de corte y VP	Comentarios
<i>Coxiella burnetii</i>	IFI, FC	IgG Fase I $\geq 1:800$ VPP 98%	Incluido criterio mayor Duke modificados
<i>Bartonella</i> spp.	IFI, ELISA	IgG $\geq 1:1600$ VPP 95,5%	Propuesto criterio mayor. Diferenciación especies complicada
<i>Brucella melitensis</i>	Aglutinación (Wright's)	$\geq 1:80$	Reguera y cols (2003) 11 pat. $> 1/160$
<i>Chlamydia</i> spp.	IFI, FC	$\geq 1:128$	Reac. cruzada con <i>Bartonella</i> spp.
<i>Legionella pneumophila</i>	IFI	$\geq 1:128$	Papel dudoso de EI
<i>M. pneumoniae</i>	IgM EIA, FC	$> 1/64$	Papel dudoso en EI

Procesamiento de válvulas cardiacas



Laboratorio de Microbiología

División de la muestra en 3-4 fragmentos equivalentes

Envío urgente lab
No añadir medio de transporte#
Si demora, refrigerar 4°C

Anatomía Patológica

- Examen histológico
- Tinciones especiales
- Inmunohistología
(*C. burnetii*, *B. quintana*, *B. henselae*, *T. whipplei*)
- Microscopía electrónica (casos especiales)

Cultivo

- T. Gram
- Medios enriquecidos
- 2-3 días (10-45d) incubación
- CO₂ y Anaerobiosis
- Caldo BHI - 10 días*

Cultivo celular

- ✓ *Bartonella sp.*
- ✓ *C. burnetii* (BSL3)
- ✓ *T. whipplei*
- Técnica shell-vial
- Inmunofluorescencia
- PCR para identificar

PCR

- ✓ Universal 16S rARN
- ✓ Específicas

Limitaciones del cultivo de VC

Los resultados de cultivo de VC se deben interpretar con precaución, sobre todo en casos de EI HC-, debido a los falsos positivos

La tinción de Gram es poco sensible

El cultivo de la válvula es poco sensible y poco específico



	S%	E%	VPN%	VPP%
Gram	12	100	26	100
Cultivo VC	8	94	24	80
HGUGM	25,4	71,6	93,3	5,8

Breitkopf. *Circulation* 2005;111:1415-21

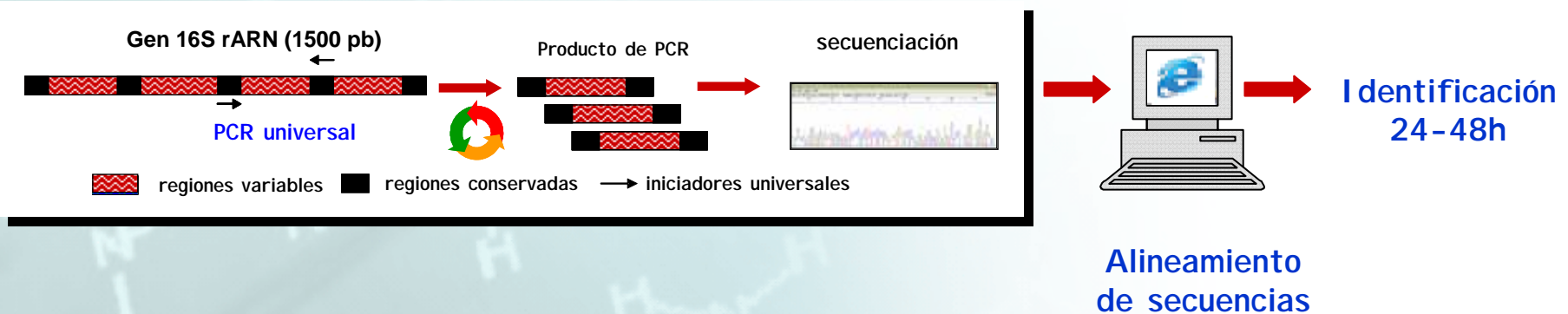
Muñoz. *JCM* 2008;46: 2897-2901

TABLE 2. Data on the 10 patients with IE who had a false-positive heart valve culture

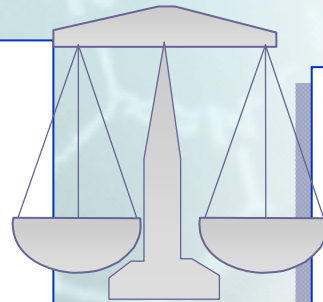
Case	Valve	Organism identified by:		
		Heart valve culture	Blood culture	Valve PCR
1	Mitral, native	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
2	Aortic, native	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>S. mutans</i>
3	Aortic, native	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
4	Aortic, native	Coagulase-negative staphylococci	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
5	Mitral, native	Coagulase-negative staphylococci	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
6	Mitral, native	Coagulase-negative staphylococci	Negative	<i>Streptococcus infantarius</i>
7	Mitral, prosthetic	<i>S. epidermidis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
8 *	Aortic, native	Viridans group <i>Streptococcus</i> species	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
9	Aortic, prosthetic	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
10	Aortic, prosthetic	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>

Método moleculares en el diagnóstico de EI

La mayoría de los trabajos publicados emplean PCR universal del gen 16S rARN seguida de secuenciación



- Excelentes resultados en válvulas, verrugas y abscesos
- Detecta ADN en pacientes tratados



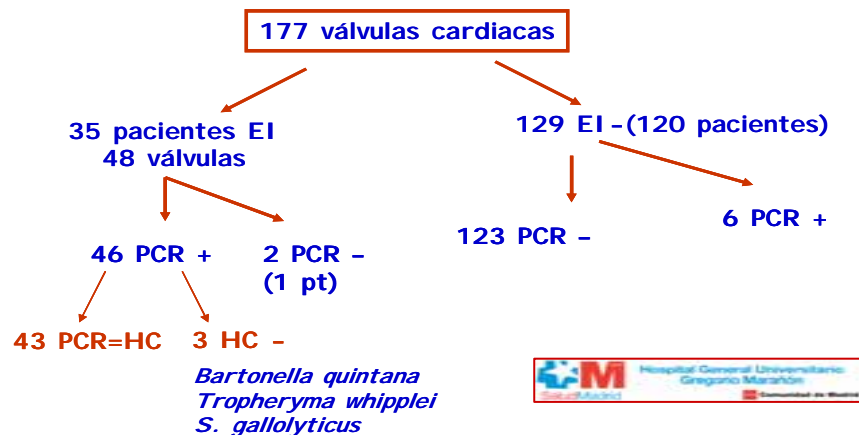
- Baja sensibilidad analítica de detección
- Poco útil en sangre periférica

La PCR universal del gen 16S rARN asociada a secuenciación, ha demostrado ser sensible y específica para el Dx de EI en tejido de válvulas cardiacas



	S%	E%	VPN%	VPP%
Breitkopf C (1)	41	100	35	100
Bosshard P (2)	94,1	100	90	100
Greub B (4)	61	100	74	100
Marín M (5)	97	93,3	85	99

1 Circulation 05; 2 CID 03; 3 SJID 01; 4 Am J Med 05; 5 Medicine (Baltimore) 07



**Molecular Diagnosis of Infective Endocarditis:
A Helpful Addition to the Duke Criteria**

Clinical Medicine & Research
Volume 2, Number 4, 200-208
©2004 Clinical Medicine & Research
http://www.clinmedres.com

Tahir Tak MD, PhD, Department of Internal Medicine, Division of Cardiology, University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, Texas
Sanjay K. Shukla, PhD, Molecular Microbiology Laboratory, Marshfield Clinic Research Foundation, Marshfield, Wisconsin



Polymerase Chain Reaction to Diagnose Infective Endocarditis: Will It Replace Blood Cultures?

Peter A. Rice and Guillermo E. Madico
Circulation 2005;111:1352-1354



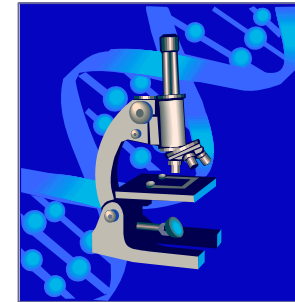
EI: 1-10 bacterias/ml en sangre periférica

Contaminación de Taq polimerasa con ADN:

baja sensibilidad analítica (100 ufc/ml)

Pocos estudios en diagnóstico de EI, la mayoría en sepsis

Datos poco concluyentes



PCR's específicas en sangre o suero

Diagnosis of *Bartonella* Endocarditis by a Real-Time Nested PCR Assay Using Serum

Zaher Zeaiter, Pierre-Edouard Fournier, Gilbert Greub, and Didier Raoult*

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2003, p. 919-925

- ✓ Muy sensibles y específicas pero es necesario conocer datos epidemiológicos para elegir la PCR más adecuada
- ✓ Pocos casos estudiados

Septifast® (Roche)

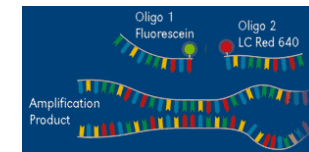
Diagnóstico de sepsis en muestra de sangre (EDTA)

PCR multiplex tiempo real, detección con sondas FRET

Reactivos Grado M (libres de ADN). Muy sensible



Gram (-)	Gram (+)	Fungi
<ul style="list-style-type: none">• <i>Escherichia coli</i>• <i>Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)</i>• <i>Serratia marcescens</i>• <i>Enterobacter (cloacae / aerogenes)</i>• <i>Proteus mirabilis</i>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>• <i>Acinetobacter baumannii</i>• <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Staphylococcus aureus</i>• CoNS (Coagulase negative <i>Staphylococci</i>)• <i>Streptococcus pneumoniae</i>• <i>Streptococcus spp.</i>• <i>Enterococcus faecium</i>• <i>Enterococcus faecalis</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Candida albicans</i>• <i>Candida tropicalis</i>• <i>Candida parapsilosis</i>• <i>Candida krusei</i>• <i>Candida glabrata</i>• <i>Aspergillus fumigatus</i>



Identificación en aprox. 6 horas. Gen *mecA* +2h

Útil primeras dosis de tratamiento

Extracción automática

≈120€/muestra

Evaluation of the LightCycler® SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis

J. P. Casalta · F. Gouriet · V. Roux · F. Thuny · G. Habib · D. Raoult



Detección Molecular en HC +

Genotype Blood culture (Hain Life Science®)



PCR y detección por hibridación reversa en tiras con sondas de ADN inmovilizadas (aprox 4h)



Hemocultivo +
T. Gram +
Elección de tiras
G+ o G-



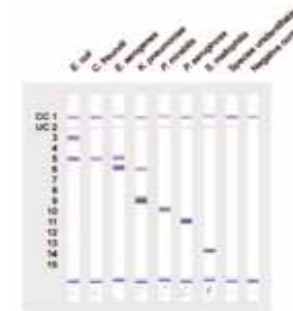
Extracción
ADN bacteriano
(20 µl) 20'



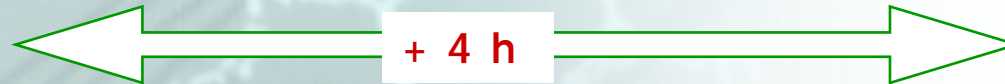
PCR
Iniciadores
marcados
con biotina
≈ 2,5h



Desnaturalización
Hibridación
Detección
30'



Identificación
15 G-
17 G+
(*mecA*, *vanA*, B)



JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2005, p. 5256-5262
0095-1137/05/4008.00+0 doi:10.1128/JCM.43.10.5256-5262.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 43, No. 10

Evaluation of a Rapid Direct Assay for Identification of Bacteria and the *mecA* and *van* Genes from Positive-Testing Blood Cultures

U. Eigner,¹ M. Weizenegger,¹ A.-M. Fahr,^{1*} and W. Witte²

Department of Microbiology and Hygiene, Limbach Laboratory, Heidelberg,¹ and Robert Koch Institute, Wernigerode Branch, Wernigerode,² Germany

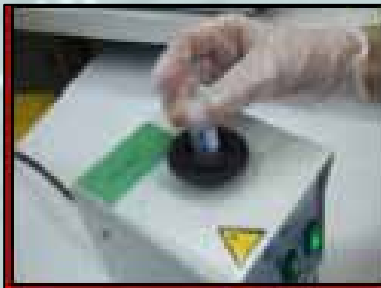
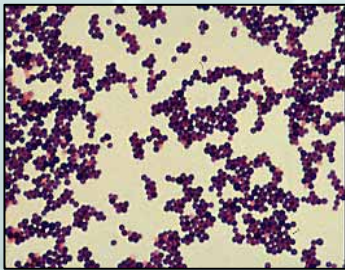
Detección Molecular en HC +

GeneXpert MRSA-SA-BC® (Cepheid)

Identificación de *S. aureus* y *S. aureus* Met-R en 1h

Muy sencillo, no necesita personal especializado

Inconveniente: Coste



Bibliografía



European Heart Journal (2009) 30, 2369–2413
doi:10.1093/eurheartj/ehp285

ESC GUIDELINES

Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009)

Infecciones asociadas a las válvulas protésicas cardíacas, las prótesis vasculares y los dispositivos de electroestimulación cardíacos

Benito Almirante^a y José M. Miró^b

Enferm Infecc Microbiol Clin 2008;26(10):647-64

REVIEW

Journal of Infection (2003) 47, 1-11

The microbial diagnosis of infective endocarditis

R.W. Watkin^a, S. Lang^b, P.A. Lambert^c, W.A. Littler^a, T.S.J. Elliott^{b,*}



Cardiol Clin 21 (2003) 207–217

CLINICAL

Diagnostic methods
Current best practices and guidelines
for identification of difficult-to-culture
pathogens in infective endocarditis

Pierre Houpihan, MD^a, Didier Raoult, MD, PhD^{b,*}

