

Котова Е. О.¹, Домонова Э. А.², Кобалава Ж. Д.¹,
Шипулина О. Ю.², Караулова Ю. Л.¹, Писарюк А. С.^{1,3}

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), Москва, Россия

² ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ ГБУЗ «ГКБ им. В. В. Виноградова» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

ИНФЕКЦИОННЫЙ ЭНДОКАРДИТ НЕУСТАНОВЛЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ: ВОЗМОЖНОСТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ И РОЛЬ МИКРОБИОЛОГИСТИКИ

Современный инфекционный эндокардит (ИЭ) характеризуется изменениями этиологического и эпидемиологического профилей, ассоциированными с увеличением частоты развития ИЭ неустановленной этиологии, что диктует необходимость поиска способов повышения эффективности диагностики. Решающее значение приобретают микробиологистика, а также высокотехнологичные методы идентификации возбудителя при исследовании культуры крови и тканей пораженного клапана сердца, определяющие своевременную диагностику и лечение, внедрение которых в практическую деятельность врача является составляющей частью персонализированной медицины. В статье рассмотрены обоснованность и особенности проведения микробиологических (культуральных), иммунохимических и молекулярно-биологических [MALDI-TOF MS (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией), полимеразная цепная реакция, секвенирование] исследований.

Ключевые слова Инфекционный эндокардит неустановленной этиологии; культуронегативный инфекционный эндокардит; микробиологические методы; иммунохимические методы; MALDI-TOF MS; полимеразная цепная реакция; микробиологистика

Для цитирования Kotova E. O., Domonova E. A., Kobalava Zh. D., Shipulina O. Y., Karaulova Y. L., Pisaryuk A. S. Infective Endocarditis With Unknown Etiology: Possibilities of Conquering and Role of Microbiologistics. *Kardiologiya*. 2021;61(1):87–97. [Russian: Котова Е.О., Домонова Э.А., Кобалава Ж.Д., Шипулина О.Ю., Караулова Ю.Л., Писарюк А.С. Инфекционный эндокардит неустановленной этиологии: возможности преодоления и роль микробиологистики. *Кардиология*. 2021;61(1):87–97].

Автор для переписки Котова Елизавета Олеговна. E-mail: kotova_eo@pfur.ru

Остро актуальную проблему современной медицины представляет инфекционный эндокардит (ИЭ) неустановленной этиологии, который, согласно данным зарубежных исследователей, диагностируется в 31–63% [1–5], а по данным отечественных авторов – в 47,2% [6] случаев. При этом следует отметить, что на протяжении последних 10 лет отмечается тенденция к некоторому росту, что, вероятнее всего, связано с активным, ранним, часто бесконтрольным, применением антибактериальных препаратов в рамках комплексной терапии, ограничениями микробиологических методов исследования, а также ростом распространенности ИЭ протезированного клапана/имплантированного внутрисердечного устройства и ИЭ, ассоциированного с оказанием медицинской помощи, этиологические причины которых часто остаются невыявленными [1–9]. Изложенное определяет высокую смертность от ИЭ в целом и особенно от ИЭ неустановленной этиологии – более 30% пациентов умирают в течение года после постановки диагноза [1, 2, 10, 11]. Своевременная расшифровка причинного инфекционного агента имеет решающее значение для выбора режима оптимальной антибактериальной терапии (АБТ) и, соответственно, благоприятного прогноза у пациентов с ИЭ, обуславливая уменьшение ча-

стоты выявления антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов, снижение необоснованной лекарственной нагрузки на пациента, стоимости курса терапии, сокращение длительности стационарного этапа лечения и увеличение выживаемости [12].

Согласно клиническим рекомендациям Европейского общества кардиологов по лечению и ведению больных ИЭ (2015), диагностика заболевания основывается на модифицированных критериях Дюка, включающих обнаружение этиопатогенетически значимых микроорганизмов в комплексе с визуализирующими исследованиями и клиническими параметрами, при этом положительные результаты микробиологического исследования крови/ткани клапана относятся к «большим» и «малым» критериям ИЭ [10, 13, 14]. Уменьшение частоты развития ИЭ неустановленной этиологии невозможно без внедрения основных принципов персонализированной медицины, включающих быструю и точную этиологическую лабораторную диагностику с использованием микробиологических, иммунохимических и молекулярно-биологических исследований, представляющих комбинацию прямых и косвенных методов. «Краеугольным камнем» увеличения частоты развития ИЭ с установленным возбудителем является повышение качества этиоло-

гической лабораторной диагностики, за что отвечает микробиологистика.

Микробиологистика

Быстрая и качественная идентификация микроорганизмов, имеющих этиопатогенетическое значение, является решающей для ведения пациентов с инфекциями крови, в первую очередь для больных ИЭ. Важное значение приобретает процесс «микробиологистики», охватывающий все возможные звенья этиологической диагностики в логической цепочке от момента взятия исследуемых биологических образцов до получения окончательного результата анализа. Изучению качества этиологической диагностики инфекций крови было посвящено крупное исследование, проведенное исследовательской группой ESCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) и ESG-BIES (The ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis) и включившее 209 лабораторий из 25 стран [15]. Полученные результаты позволили выявить основные параметры, напрямую влияющие на эффективность этиологической диагностики инфекций крови, включая ИЭ. Показано, что только 39,7% (83/209) лабораторий на первоначальном этапе диагностики эпизода лихорадки использовали более 2 тестируемых образцов (проб) для микробиологического исследования крови на стерильность. При этом 91,9% (192/209) лабораторий в качестве стандартного образца для одной пробы использовали пару флаконов с аэробной и анаэробной питательной средой. Только 33,5% (70/209) лабораторий контролировали объем взятой крови для инокуляции во флаконы ($8,1 \pm 2,2$ мл), наиболее распространенное время инкубации составляло 5 дней в 69,9% (146/209) лабораторий, а показатели позитивности бактериального роста отмечались в 14,1% случаев. Круглосуточное исследование образцов крови было доступно только в 42,4% лабораторий, из которых только 13% предоставляли круглосуточную службу по немедленной обработке проб с положительным ростом. При этом следует отметить, что в выходные и праздничные дни 9,3% лабораторий вообще не принимали образцы крови, а 15,2% не обрабатывали флаконы с положительным ростом, в то время как было выявлено, что более 40% образцов давали положительный рост именно в нерабочее время. Флаконы с культурой крови доставлялись в лаборатории в течение 4 ч (59,3% лабораторий), 12 ч (26,3%) и 24 ч (10,5%) ч. В 98,8% лабораторий использовали полуавтоматическую систему для культивирования образцов крови; 99% лабораторий, включенных в наблюдение, в качестве первого метода исследования первичной культуры крови использовали окрашивание по Граму. Только микробиологическими методами идентификации (посев

на плотные питательные среды с последующей идентификацией возбудителя) ограничивались 32,5% лабораторий, а 67,5% применяли различные быстрые методы диагностики, представленные матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией с времяпролетной масс-спектрометрией – MALDI-TOF MS (59,8% лабораторий), полимеразной цепной реакцией – ПЦР (21% лабораторий) и др. [15–19].

Таким образом, первым этапом для преодоления высокой частоты развития ИЭ неустановленной этиологии является соблюдение определенных требований, значительно повышающих качество лабораторной диагностики (табл. 1), в первую очередь, для основного, широко распространенного микробиологического исследования крови на стерильность, выполняемого в каждом случае. Рассмотрим особенности проведения лабораторных тестирований по идентификации возбудителя, доступных в современном алгоритме диагностики ИЭ.

Микробиологические (культуральные) исследования

Включают выделение чистой культуры возбудителя и его дальнейшую идентификацию по комплексу морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических и антигенных признаков. Современные автоматизированные системы инкубирования, непрерывного мониторинга роста микроорганизмов и микробиологического исследования крови (например, Microscan, Siemens Healthcare Diagnostics; BD Phoenix Automated Microbiology System; VITEK, bioMerieux) дают возможность идентифицировать большинство клинически значимых возбудителей ИЭ [20].

Существуют некоторые различия относительно количества образцов (проб) крови, достаточного для проведения исследования в полном объеме и длительности инкубирования [20]. Американская ассоциация кардиологов и Европейское общество кардиологов рекомендуют исследовать не менее трех (каждый образец включает проведение параллельного исследования во флаконах с аэробной и анаэробной питательной средой), взятых из трех разных вен с интервалом 30 мин [2, 10]. Британское общество антимикробной химиотерапии при подозрении на сепсис и острый ИЭ рекомендует взятие двух образцов крови с интервалом 1 ч, а при подозрении на подострый ИЭ – трех образцов с интервалом 6 ч [21]. Как правило, используется 3 образца крови для культивирования (всего 6 флаконов: 3 с аэробной и 3 с анаэробной питательной средой), реже берут два (каждый из которых состоит из двух флаконов с аэробной и одного с анаэробной питательной средой) [22].

Взятие образцов крови должно проводиться с соблюдением строгих требований (см. табл. 1). Полученные об-

разцы в максимально короткие сроки (не более 2–4 ч) доставляются в автоматизированные системы для инкубирования [2, 15, 20]. После этого в автоматическом режиме происходит оптическое считывание состояния индикатора, находящегося в области дна флакона и реагирующего изменением окраски на нарастание концентрации углекислого газа, синтезируемого микроорганизмами в процессе своего роста. При изменении цвета индикатора инкубатор подает сигнал, по получении которого флакон извлекают, выполняют окраску по Граму и микроскопическое исследование его содержимого, последовательный посев гемокультуры на плотные питательные среды с идентификацией микроорганизмов и определением чувствительности/резистентности к антибактериальным препаратам [23].

Стандартное время для получения роста, выделения чистой культуры и идентификации возбудителя при исследовании биологического материала на жидких и твердых питательных средах составляет от 18–24 ч до нескольких суток [7]. Этого времени достаточно для вы-

явления практически всех возбудителей ИЭ, включая *Candida spp.*, *Abiotrophia defectiva* и *Granulicatella spp.* Известно, что грамотрицательные бактерии часто дают рост во флаконах уже через 6 ч, инкубация грибов длится около 72 ч, имеются данные о необходимости сверхдлительного культивирования для *Cutibacterium acnes* (ранее *Propionibacterium*) – до 14 дней [24]. Традиционно считается, что бактерии группы НАСЕК относятся к труднокультивируемым микроорганизмам, однако современные автоматизированные системы позволяют выделять даже такого рода бактерии с увеличенным временем инкубации [25, 26]. Наряду с идентификацией возбудителя оценивается его чувствительность/резистентность к антибактериальным препаратам, что достигается применением традиционных подходов (например, метод серийных разведений и его модификации, метод Kirby–Bauer) [23].

При соблюдении всех условий проведения исследования ожидается, что большинство возбудителей ИЭ выявляются при использовании современных систем гемокультивирования. Однако взятие крови на фоне АБТ,

Таблица 1 (начало). Требования, повышающие качество исследований по идентификации возбудителя при диагностике ИЭ, доступные для практического внедрения [2, 6, 14, 15]

Обязательные параметры, влияющие на качество проведения исследования	Критические ошибки	Пути по повышению качества проведения исследования
Микробиологические исследования – позволяют идентифицировать микроорганизм на основе фенотипических (морфология колоний, выращенных на твердых субстратах), биохимических и иммунологических признаков после предварительного культивирования на жидких и твердых питательных средах		
- При подозрении на ИЭ проводится взятие не менее 3 образцов крови с интервалом 30 мин между каждой пробой. - При подозрении на лихорадку неясного генеза – не менее 2 образцов крови с интервалом не менее 1 ч между первой и последней пробой. - Взятие образцов крови осуществляется путем пункции разных периферических вен со строгим соблюдением правил асептики и антисептики. - Для исключения вероятности контаминации образца во время пункции первые 2 мл крови для исследования не используются (удаляются). - Взятие биологических образцов проводится до назначения АБТ. - Исследование каждого биологического образца проводится в аэробных и анаэробных условиях (два флакона: с аэробной и анаэробной питательной средой). - Достаточный объем исследуемого образца крови на один флакон (8–10 мл). - Доставка биологических образцов в диагностическую лабораторию должна осуществляться в течение 2–4 ч. - Время инкубации биологических образцов должно быть достаточным (от 18–24 ч до 5–7 дней). - При проведении исследования на фоне АБТ: - рассмотреть возможность отмены АБТ на 48–72 ч; - проводить исследование в специальных условиях (например: использование сорбентов для антибиотиков)	- Недостаточное количество образцов крови для исследования. - Взятие крови из центральных катетеров. - Взятие крови на фоне активной АБТ в отсутствие возможности использования специальных сред для исследования. - Взятие биологических образцов в один флакон (например, только с аэробной питательной средой). - Малый объем исследуемого образца крови (<8 мл). - Поздняя доставка биологического материала в диагностическую лабораторию (>4 ч, крайне поздно >24–48 ч). - Длительное хранение биологических образцов без соблюдения температурного режима. - Недостаточное время инкубации биологических образцов	- Изменение режима работы лаборатории с учетом необходимости круглосуточного культивирования образцов крови и анализа проб с «положительным ростом». - Использование современных автоматизированных систем культивирования и непрерывного мониторинга роста микроорганизмов в образцах крови. - Использование качественных питательных сред, отвечающих современным требованиям (например, флаконы с обогащенной питательной средой). - Соблюдение временного промежутка и температурного режима при доставке исследуемых образцов в диагностическую лабораторию. - Соблюдение длительности периода инкубации биологических образцов. - Интеграция быстрых методов идентификации возбудителя (MALDI–TOF MS). - При подозрении на ИЭ, вызванный труднокультивируемыми патогенами, проводить дополнительные исследования (иммунохимические, ПЦР, секвенирование)

Таблица 1 (продолжение). Требования, повышающие качество исследований по идентификации возбудителя при диагностике ИЭ, доступные для практического внедрения [2, 6, 14, 15]

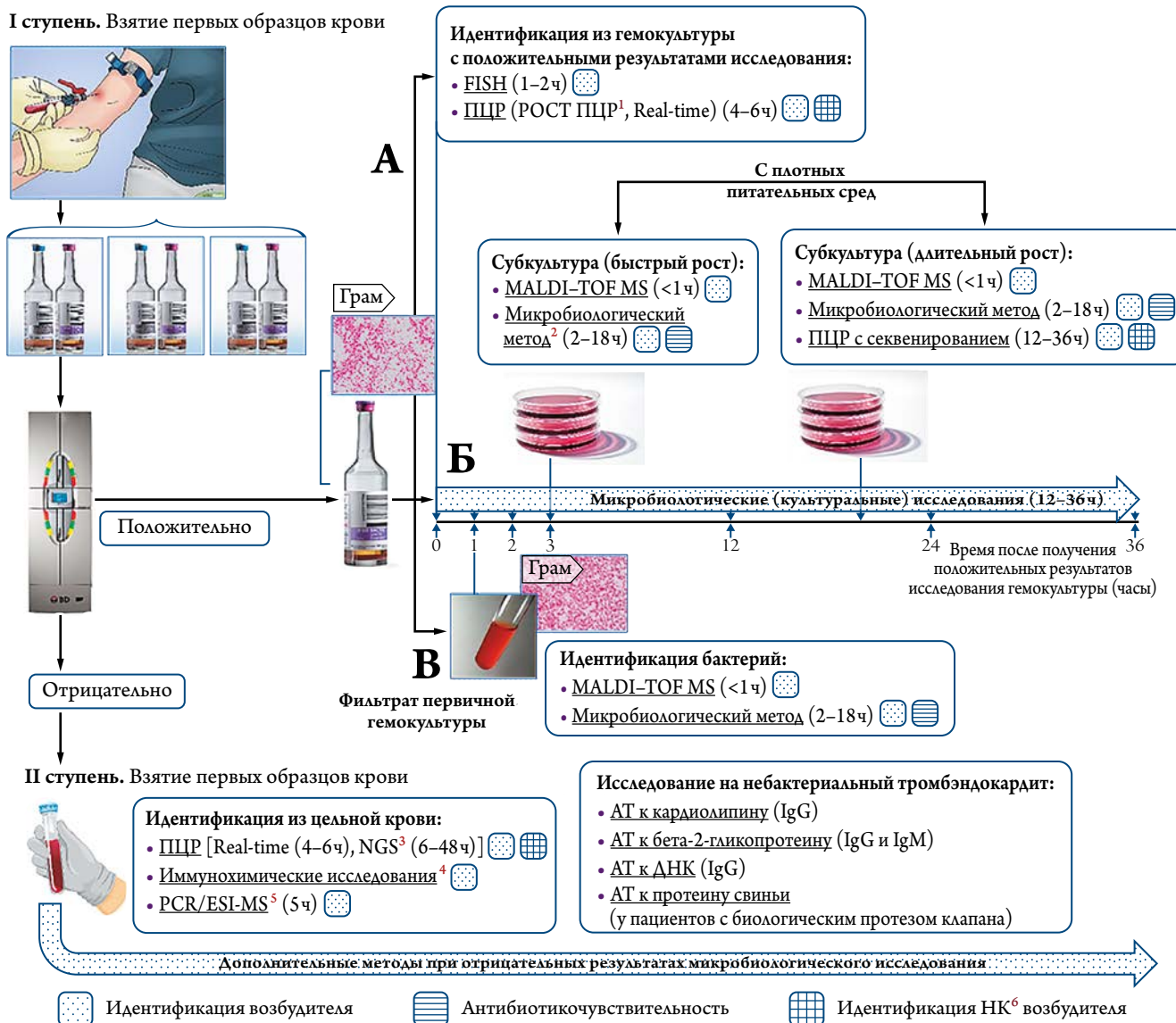
Обязательные параметры, влияющие на качество проведения исследования	Критические ошибки	Пути по повышению качества проведения исследования
Иммунохимические исследования – в основе метода лежит специфическое взаимодействие антиген – антитело, позволяющее качественно или количественно определять различные низкомолекулярные соединения (антигены различных возбудителей; Ig классов А, М, G и др.)		
Исследование наиболее информативно при подозрении на ИЭ, вызванный атипичными возбудителями: <i>Coxiella burnetii</i>, <i>Bartonella spp.</i>, <i>Brucella spp.</i>, <i>Tropheryma whippelii</i>, <i>Mycoplasma spp.</i>, <i>Legionella spp.</i>, <i>Chlamydia/Chlamydophila spp.</i> и др.	- Проведение исследования не по показаниям (поиск неспецифических АТ к АГ неопределенного круга возбудителей). - Доставка и хранение биологических образцов без соблюдения температурного режима	- Использование НР с доказанным отсутствием или минимально низким процентом перекрестной реактивности с АТ к АГ других микроорганизмов. - Соблюдение температурного режима при доставке и хранении исследуемых биологических образцов
МАНК (ПЦР) и секвенирование – методы, направленные на обнаружение специфических участков ДНК или РНК микроорганизмов в различных типах биологического материала в кратчайшие сроки		
Чрезвычайная важность преаналитического этапа! - Соблюдение правил асептики и антисептики при взятии образца крови/ткани иссеченного клапана для исследования. - Взятие образца крови осуществляется путем пункции периферических вен. - Взятие образца крови следует производить в стерильную пробирку с 6% ЭДТА. - При взятии крови для исключения вероятности контаминации образца во время пункции первые 2 мл для исследования не используются (удаляются)	- Проведение исследования не по показаниям (поиск НК неопределенного круга возбудителей). - Взятие крови из катетеров. - Использование в качестве антикоагулянта гепарина. - Доставка и хранение биологических образцов без соблюдения температурного режима	- Предпочтительно использование НР на основе ПЦР с видоспецифичными праймерами с высокими показателями аналитической чувствительности и специфичности. - Использование НР с доказанным отсутствием или минимально низким процентом влияния интерферирующих веществ. - Использование международных баз геномных данных. - Соблюдение температурного режима при доставке и хранении исследуемых биологических образцов
MALDI-TOF MS – метод, основанный на анализе белковых спектров микроорганизмов, используется для точного видового определения большинства возбудителей, значительно сокращая сроки идентификации при проведении микробиологического исследования		
Аналогично микробиологическим исследованиям (см. выше)	Аналогично микробиологическим исследованиям (см. выше)	- Расширение качественной базы данных референтных масс-спектров микроорганизмов. - При проведении анализа необходимо учитывать, что существуют определенные трудности дифференциации сходных/близкородственных организмов, идентификации полифлоры. - При возникновении трудностей идентификации возбудителей применять дополнительные методы (ПЦР, секвенирование)

ИЭ – инфекционный эндокардит; АБТ – антибактериальная терапия; АТ – антитела; АГ – антигены; МАНК – методы амплификации нуклеиновых кислот; ПЦР – полимеразная цепная реакция; НК – нуклеиновые кислоты, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; РНК – рибонуклеиновая кислота; ЭДТА – этилендиаминуксусная кислота, предотвращает свертывание крови в пробирке; MALDI-TOF MS – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией; НР – наборы реагентов.

а также наличие трудно/некультивируемых этиопатогенетически значимых микроорганизмов определяют высокую частоту развития ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования крови [2, 3, 27, 28]. Очевидно, что неотъемлемым условием успешной идентификации возбудителя в крови является получение адекватного количества качественных образцов крови до назначения АБТ (см. табл. 1). Однако ввиду часто позднего обращения пациентов за медицинской помощью у большинства обследуемых АБТ, как правило, про-

водится уже на догоспитальном этапе. Для таких случаев рекомендовано рассмотреть возможность прекращения приема обследуемыми АБТ на несколько дней (согласно некоторым данным, до 10 дней) с повторным микробиологическим исследованием крови и/или использование для выполнения культивирования специальных флаконов, содержащих обогащенную питательную среду и сорбент для антибиотиков (например, активированный уголь или полимерные гранулы) [21]. К сожалению, в настоящее время у большинства пациентов с ИЭ, получаю-

Рисунок 1. Алгоритм этиологической диагностики инфекционного эндокардита



А – определение возбудителя из гемокультуры с положительными результатами исследования, без дополнительной обработки; Б – определение возбудителя после посева первичной гемокультуры на плотные питательные среды; В – определение возбудителя из фильтрата первичной гемокультуры.

1. Тестирование в месте оказания медицинской помощи (Point-of-care testing, ПОСТ, экспресс-тестирование); 2. Микробиологический метод – автоматизированные системы культивирования; 3. NGS – секвенирование нового поколения; 4. Обнаружение антител (АТ) к *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Brucella* spp., *Tr. whipplei*, *Mycoplasma* spp., *Legionella* spp., *Chlamydia/Chlamydophila* spp. и грибам); 5. PCR/ESI-MS – электрораспылительная ионизационная масс-спектрометрия; 6. НК – нуклеиновая кислота (ДНК или РНК).

щих АБТ, эти рекомендации не выполняются, что и определяет неприемлемо высокий уровень ложноотрицательных результатов.

Второй причиной ИЭ с отрицательными результатами микробиологического исследования крови является ИЭ, вызванный труднокультивируемыми патогенами – *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. и *Tr. whipplei*, на долю которых приходится до 37, 28 и 6% случаев ИЭ неустановленной этиологии соответственно [7, 29, 30]. К другим редким возбудителям ИЭ относятся *Cutibacterium acnes*, *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp., *Chlamydia/Chlamydophila* spp., бактерии

из группы HACEK, *Streptococcus defectiva* (например, *Gemella* spp.), *Granulicatella* spp., *Abiotrophia* spp. или грибы (преимущественно *Candida* spp.) [2, 7, 25].

Для преодоления высокой распространенности ИЭ неустановленной этиологии используется ряд высокотехнологичных исследований, которые включены в мультимодальную стратегию для оптимизации выявления этиологического агента, представленных иммунохимическими и молекулярно-биологическими методами, среди которых наиболее распространены ПЦР, FISH (fluorescence in situ hybridization, флуоресцентная гибридизация in situ), MALDI-TOF MS (рис. 1), а также пред-

ложены требования, повышающие качество проводимых исследований, непосредственно применимые на практике (табл. 1).

Иммунохимические исследования

Направлены на обнаружение специфических антител к антигенам искомых возбудителей, характеризуются высокой аналитической специфичностью и чувствительностью, быстротой проведения. Они применяются при подозрении на ИЭ, ассоциированный с атипичными возбудителями: *Coxiella burnetii*, *Bartonella spp.*, *Brucella spp.*, а также для *Tr. whipplei*, в некоторых случаях для *Mycoplasma spp.*, *Legionella spp.*, *Chlamydia/Chlamydophila spp.* и грибов [31]. Наиболее достоверные результаты иммунохимического исследования продемонстрированы для *Coxiella burnetii* (большой критерий ИЭ иммуноглобулин G – IgG фазы I >1:800) [10, 13]. Среди ограничений следует отметить следующее: перекрестная реактивность (*Bartonella spp.* и *Chlamydia/Chlamydophila spp./Legionella spp.*; *Bartonella spp.* и *Coxiella spp.*), выявление анамнестических антител (антитела класса IgG к антигенам возбудителей заболеваний, перенесенных ранее) и не связанных с оцениваемым эпизодом ИЭ, невозможность исследования на антибиотикорезистентность и трудности применения метода у пациентов с нарушениями иммунной системы [10, 13, 31].

Молекулярно-биологические исследования

Включают методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), секвенирование, методы на основе масс-спектрометрического анализа.

МАНК и секвенирование

Наиболее широкое распространение среди молекулярно-биологических методов, основанных на МАНК, включенных в алгоритм диагностики ИЭ, получила ПЦР, в основе которой лежит многократное избирательное копирование (амплификация) определенного участка нуклеиновых кислот (НК).

Для ИЭ неустановленной этиологии при выполнении лабораторных исследований наиболее эффективно применение видоспецифичной ПЦР в формате моноплекс (определение одного вида возбудителя) или мультиплекс (несколько видов возбудителей одновременно в одной постановке) в связи с доказанной ее высокой диагностической эффективностью для выявления как трудно/некультивируемых микроорганизмов, так и других возбудителей с доказанной этиопатогенетической значимостью при ИЭ. В отсутствие предположений о потенциальном возбудителе ИЭ с неустановленной этиологией возможно проведение родоспецифичной ПЦР [выявление более широкой генетической группы возбудителей – рода, семейства (например, *Streptococcus spp.*), без возможности

определения до вида в рамках проводимого исследования, также в формате моно/мультиплекс] с целью сужения диагностического поиска с последующей расшифровкой до вида (при необходимости), например, с помощью использования наборов реагентов на основе видоспецифичной ПЦР или секвенирования по Сенгеру.

В современной этиологической диагностике ИЭ на определенных этапах могут применяться различные высокотехнологичные методы исследования (см. рис. 1): флуоресцентная гибридизация *in situ*, FISH (основана на гибридизации искомых микроорганизмов с помощью флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов, комплементарных специфическим участкам гена 16S или 18S рРНК, что позволяет идентифицировать возбудителя до рода, установить его местонахождение); ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ; основана на определении искомой мишени в качественном или преимущественно количественном формате после каждого цикла амплификации); секвенирование, в том числе секвенирование нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS высокопроизводительное секвенирование, массовое параллельное секвенирование) – одно из наиболее перспективных современных направлений [32–35]. NGS – общее название для ряда различных методов, позволяющих одновременно определять последовательности НК либо для очень большого количества коротких молекул ДНК (до нескольких миллионов молекул длиной 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.

Применяемые в настоящее время молекулярно-биологические исследования обладают несомненными временными преимуществами, высокой диагностической эффективностью (приближающейся к 100%) с возможностью идентификации трудно/некультивируемых микроорганизмов. Из важных особенностей МАНК следует отметить: возможность получения ложноотрицательных/дискордантных результатов (ограниченный перечень идентифицируемых патогенов, относительные трудности применения метода при обследовании пациентов на АБТ, связанные со снижением концентрации возбудителя в крови, и/или влияние интерферирующих веществ, относящихся к ингибиторам); ложноположительных результатов (идентификация этиопатогенетически незначимых возбудителей), для преодоления которых следует отдавать предпочтение видоспецифичной ПЦР (см. табл. 1); несовершенство разработанных алгоритмов по определению генетических маркеров антибиотикорезистентности; в ряде случаев высокая стоимость расходных материалов и необходимость создания специализированной лаборатории [6, 36, 37]. В настоящее вре-

моя совершенствование МАНК заключается в разработке и внедрении диагностических подходов, направленных на выявление генетических маркеров резистентности и факторов вирулентности микроорганизмов.

Методы, основанные на масс-спектрометрическом анализе

В последнее время в лабораторной диагностике инфекционных болезней получили распространение протеомные методы исследования, среди которых в клинической микробиологии наиболее широко известна MALDI-TOF MS, базирующаяся на качественном и количественном измерении физических свойств веществ методами спектроскопии (анализ спектра поглощения исследуемого материала) и характеризующаяся сочетанием мощных аналитических возможностей и информативной базы данных (по состоянию на 2019 г. – до 2 700 видов микроорганизмов) с высокой автоматизацией, скоростью и простотой выполнения исследований [38]. MALDI-TOF MS позволяет проводить идентификацию возбудителя, что в сочетании с микробиологическим исследованием дает возможность с высокой точностью идентифицировать широкий спектр микроорганизмов, включая труднокультивируемые, в частности, род *Brucella spp.*

Среди особенностей применения метода в рамках диагностики ИЭ следует отметить, что биологическим материалом для исследования служит гемокультура (образцы крови пациента, культивированные во флаконах с аэробной и анаэробной питательной средой в специальных анализаторах), на получение которой требуется не менее 24 ч, как при проведении микробиологического исследования [39]. Выделяют два варианта MALDI-TOF MS: традиционная (объектом исследования служат колонии бактерий, выращенные на твердой питательной среде) и прямая (объект исследования – первичная гемокультура, т.е. взвесь микробных клеток, клеток крови и детрита в жидкой питательной среде) [40, 41]. Таким образом, после получения сигнала из автоматического анализатора о наличии роста микроорганизмов во флаконе время идентификации возбудителя при проведении прямой MALDI-TOF MS составляет не более 1 ч, а при традиционной MALDI-TOF MS – 16–18 ч (см. рис. 1). В настоящее время проводятся исследования по применению метода MALDI-TOF MS в сочетании с прямой идентификацией культуры крови, дополненные прямым определением чувствительности к АБТ путем тестирования фильтрата первичной гемокультуры. Это сокращает время получения окончательного результата до 11,4 ч по сравнению с 56,3 ч при использовании традиционного микробиологического метода [42].

Совершенствование методов MALDI-TOF MS также направлено на разработку способов выявления специфической

резистентности и факторов вирулентности (дифференцирование *Staphylococcus aureus* MRSA и MSSA; определение резистентности к бета-лактамам, основанное на детекции деградации бета-лактамов антибиотиков) [43–45]. Кроме того, имеются данные об успешном применении метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии в этиологической диагностике ИЭ, позволяющего обнаруживать специфические белки – маркеры возбудителей ИЭ непосредственно в анализируемом материале (кровь, биоптаты), минуя стадии предварительного посева на питательные среды [46, 47]. Разрабатываются методы, объединяющие ПЦР с ионизацией путем распыления в электрическом поле и масс-спектрометрию (PCR/ESI-MS – электрораспылительная ионизационная масс-спектрометрия) [48, 49].

Исследование ткани клапана сердца

Хирургическое лечение ИЭ требуется в 25–53% случаев [2, 11]. Последующее изучение тканей клапана сердца включает два важных этапа: гистологическое и этиологическое исследования, которые при подозрении на ИЭ должны проводиться даже в отсутствие видимых изменений. Показано, что характер воспаления зависит от вида этиологического агента, а также от длительности и активности заболевания. ИЭ, вызванный *S. aureus*, как правило, ассоциирован с острым воспалением и характеризуется обширной нейтрофильной инфильтрацией с крупными колониями микроорганизмов и соответствующими участками разрушения ткани клапана. Для подострого ИЭ, вызванного менее вирулентными организмами (например, зелеными стрептококками), характерно чередование участков нейтрофильного воспаления и бактериальных колоний с признаками регенерации с появлением фибрина и мононуклеарных клеток. В случае ИЭ, ассоциированного с *Bartonella spp.*, *C. burnetii* или *Tr. whipplei*, в клапанах определяются признаки хронического воспаления с преобладанием инфильтрации мононуклеарными клетками, макрофагами (для *C. burnetii* или *Tr. whipplei* – пенистые макрофаги) и лимфоцитами (для *Bartonella spp.*), без нейтрофилов, при этом макроскопически они могут иметь абсолютно неизменный вид [50], что ошибочно может приниматься за дегенеративные проявления. Помимо гистологического исследования, направленного на выявление признаков воспалительного процесса, необходимо определение наличия бактерий в ткани клапана, в первую очередь микроскопическими методами, позволяющими увидеть скопление колоний микроорганизмов как на поверхности, так и в толще тканей. Однако методами окрашивания определяются не все возбудители, часто по причине применения АБТ (изменяется морфология возбудителя) или инфицирования внутриклеточными возбудителями. Следует отметить, что нали-

чие возбудителя в ткани клапана не обязательно указывает на активный ИЭ, так как гистологическая элиминация микроорганизмов происходит значительно позже, поэтому окончательный результат исследования в ряде случаев носит субъективный характер и напрямую зависит от квалификации персонала, выполняющего анализ [51].

Идентификация возбудителя с поверхности ткани клапана или из вегетаций относится к патологическим критериям Дюка (2015 г.), в связи с чем практически все образцы тканей оперированных клапанов исследуются на наличие возбудителя методами, аналогичными таковым при исследовании крови на стерильность [7, 10, 21]. Если этиологический агент не установлен до хирургического вмешательства, например, микробиологическими или иммунохимическими (определение специфических антител к антигенам *S. burnetii*) методами, то иссеченные ткани пораженного клапана должны подвергаться обязательной гистопатологической и микробиологической оценке. Если возбудитель ИЭ установлен, то дополнительные микробиологические исследования резецированного клапана сердца при несоблюдении строгих правил асептики, минимизирующих риск контаминации, могут внести путаницу в идентификацию этиопатогенетического агента в связи с возможностью получения ложноположительных результатов. Ряд исследований продемонстрировал низкую диагностическую чувствительность и специфичность (6–26%) выявления этиологии ИЭ при исследовании тканей клапанов сердца [28, 51, 52]. Показано, что число дискордантных результатов микробиологического исследования тканей клапана сердца у оперированных пациентов по поводу ИЭ достигало 36%, при этом у пациентов без признаков ИЭ ложноположительные результаты микробиологического исследования тканей клапана сердца составляли 28%, что объясняется контаминацией во время взятия или предобработки (ошибки преаналитического этапа) [52]. В связи с низкой специфичностью идентификации выделяемых культур с поверхности клапанов сердца исследование последних микробиологическими методами можно рекомендовать только в случае ИЭ с неустановленным возбудителем или ИЭ с противоречивыми результатами микробиологического исследования крови до операции. Среди новых методов этиологической диагностики предпочтение следует отдавать молекулярно-биологическим (в особенности видоспецифичной ПЦР), отличающимся высокой чувствительностью и специфичностью, что чрезвычайно необходимо [6, 32, 33, 35].

Заключение

Современный инфекционный эндокардит отличается ростом распространенности заболевания с неустановленной этиологией, связанного с изменениями эпидемиологического профиля (увеличение частоты развития инфекционного эндокардита протезированных клапанов,

внутрисердечных устройств и нозокомиальных форм), а также с низкой частотой бактериемии по причине широкого использования антибактериальной терапии на догоспитальном этапе, что обуславливает необходимость поиска способов повышения эффективности диагностики.

Решение проблемы ранней и точной этиологической диагностики и, соответственно, эффективного лечения невозможно без развития и совершенствования микробиологии. В первую очередь следует уделить внимание требованиям к исследованию крови при подозрении на инфекционный эндокардит, а именно: тестирование как минимум двух образцов культуры крови, каждый из которых состоит из двух флаконов с аэробной и анаэробной питательной средой, взятие достаточного объема крови для анализа, желательное до начала антибактериальной терапии. Именно некачественное проведение преаналитического этапа определяет высокую вероятность получения ложноположительного или ложноотрицательного результата. Важным вопросом диагностики инфекций крови, в том числе инфекционного эндокардита, является недостаточный охват лечебных учреждений многопрофильными лабораториями, работающими в режиме 24/7, что имеет решающее значение для улучшения качества диагностики (по данным литературы, 40–70% образцов поступают в лабораторию или дают положительный рост именно в нерабочие часы), а длительный период хранения образцов или позднее взятие крови значительно снижают вероятность идентификации этиопатогенетически значимого инфекционного агента. Одним из решений по 24-часовому охвату работы лаборатории может быть сотрудничество с крупными лабораториями, работающими в круглосуточном режиме.

Разработка и внедрение в практику новых медицинских технологий, специфических методов диагностики позволили существенно улучшить этиологическую диагностику инфекционного эндокардита, однако идеальное исследование в настоящее время пока не разработано, все рассмотренные в статье приемы обладают как преимуществами, так и недостатками.

Традиционное микробиологическое исследование наиболее широко применяется в диагностике инфекционного эндокардита и отличается высокой аналитической чувствительностью и специфичностью, возможностью определения антибиотикорезистентности, при неприемлемо большой длительности проведения исследования, с высокими требованиями к взятию биологического материала и высокой частотой получения ложноотрицательных результатов (инфекционный эндокардит неустановленной этиологии). Для повышения качества микробиологических исследований в настоящее время рекомендуется использование современных автоматизированных систем инкубирования и непрерывного мо-

нитинга роста микроорганизмов, применение всех возможных способов минимизации влияния антибактериальной терапии на результаты, позволяющих идентифицировать большинство значимых возбудителей инфекционного эндокардита.

Иммунохимические исследования при высокой аналитической чувствительности и специфичности ограничены возможностью получения ложноположительных результатов и невозможностью определения антибиотикорезистентности.

Молекулярно-биологические методы (методы амплификации нуклеиновых кислот, секвенирование) характеризуются быстротой получения результата, крайне высокой аналитической чувствительностью и специфичностью, но ограничены высокой стоимостью и многоэтапностью проведения анализа, строгими требованиями к оснащению лаборатории и качеству наборов реагентов, а также отсутствием возможности определения чувствительности к широкому спектру антибиотиков, вероятностью получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов тестирования.

Методы, основанные на масс-спектрометрическом анализе, отличаются высокой производительностью, аналитической и диагностической чувствительностью/специфичностью и низкой стоимостью (при условии наличия обширной, достаточной качественной базы данных референтных масс-спектров), но ограничены возможностью проведения исследования только из гемокультуры, труд-

ностями идентификации ко-патогенов, внутриродовой и внутривидовой дифференциации, сложностями определения резистентности возбудителей к антибиотикам.

Достоверным методом диагностики инфекционного эндокардита всегда считалось исследование ткани пораженного клапана сердца, однако вероятность получения ложноотрицательных/ложноположительных результатов исследования определяет необходимость комплексного исследования, включающего гистологическую оценку изменений клапана, дополненную выявлением этиологического агента из самой ткани, оптимальнее всего методами амплификации нуклеиновых кислот.

Таким образом, сочетание принципов микробиологии с достижениями новых высокотехнологичных методов (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией, полимеразная цепная реакция, секвенирование, флуоресцентная гибридизация *in situ*, секвенирование нового поколения) при исследовании культуры крови и тканей пораженного клапана сердца – обязательные элементы успешной своевременной этиологической диагностики инфекционного эндокардита, внедрение которых в практическую деятельность врача является составляющей неотъемлемой частью персонализированной медицины.

Авторами не заявлен конфликт интересов.

Статья поступила 08.06.20

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Habib G, Erba PA, Iung B, Donal E, Cosyns B, Laroche C et al. Clinical presentation, aetiology and outcome of infective endocarditis. Results of the ESC-EORP EURO-ENDO (European infective endocarditis) registry: a prospective cohort study. *European Heart Journal*. 2019;40(39):3222–32. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz620
- Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongioni MG, Casalta J-P, Del Zotti F 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). *European Heart Journal*. 2015;36(44):3075–128. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv319
- Murdoch DR. Clinical Presentation, Etiology, and Outcome of Infective Endocarditis in the 21st Century: The International Collaboration on Endocarditis–Prospective Cohort Study. *Archives of Internal Medicine*. 2009;169(5):463–73. DOI: 10.1001/archinternmed.2008.603
- Tyrin V.P. Infective endocarditis. 2nd edition, expanded and revised. -М.: GEOTAR-Media;2013. - 368 p. [Russian: Тюрин В.П. Инфекционные эндокардиты. 2-е издание, дополненное и переработанное. - М.: ГЕОТАР-Медиа, 2013. - 368с]. ISBN 978-5-9704-2080-5
- Danilov A.I., Alekseeva I.V., Asner T.V., Vlasova E.E., Drozdovich E.L., Elokhina E.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 S1):18–9. [Russian: Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В., Власова Е.Е., Дроздович Е.Л., Елохина Е.В. и др. Реальная практика терапии инфекционного эндокардита в РФ: промежу-
- точные результаты исследования МАЭСТРО. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013;15(2 S1):18–9]
- Kotova E.O., Domonova E.A., Karaulova Yu.L., Milto A.S., Pisaryuk A.S., Silvestrova O.Yu. et al. Infective endocarditis: Importance of molecular biological techniques in etiological diagnosis. *Therapeutic Archive*. 2016;88(11):62–7. [Russian: Котова Е.О., Домонова Э.А., Караулова Ю.Л., Мильто А.С., Писарюк А.С., Сильвейстрова О.Ю. и др. Инфекционный эндокардит: значение молекулярно-биологических методов в этиологической диагностике. *Терапевтический архив*. 2016;88(11):62–7]. DOI: 10.17116/terarkh2016881162-67
- Fournier P, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta J, Arzouni J et al. Comprehensive Diagnostic Strategy for Blood Culture–Negative Endocarditis: A Prospective Study of 819 New Cases. *Clinical Infectious Diseases*. 2010;51(2):131–40. DOI: 10.1086/653675
- Moiseev V.S., Kobalava Zh.D., Pisaryuk A.S., Milto A.S., Kotova E.O., Karaulova Yu.L. et al. Infective Endocarditis in Moscow General Hospital: Clinical Characteristics and Outcomes (Single-Center 7 Years' Experience). *Kardiologiya*. 2018;58(12):66–75. [Russian: Моисеев В.С., Кобалава Ж.Д., Писарюк А.С., Мильто А.С., Котова Е.О., Караулова Ю.Л. и др. Инфекционный эндокардит: клиническая характеристика и исходы (7-летний опыт лечения и наблюдения в многопрофильной городской больнице). *Кардиология*. 2018;58(12):66–75]. DOI: 10.18087/cardio.2018.12.10192
- Morpeth S. Non-HACEK Gram-Negative Bacillus Endocarditis. *Annals of Internal Medicine*. 2007;147(12):829–35. DOI: 10.7326/0003-4819-147-12-200712180-00002
- Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ et al. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicro-

- bial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 2015;132(15):1435–86. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000296
11. Thuny F, Grisoli D, Collart F, Habib G, Raoult D. Management of infective endocarditis: challenges and perspectives. *The Lancet*. 2012;379(9819):965–75. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60755-1
12. Korber F, Zeller I, Grünstädl M, Willinger B, Apfalter P, Hirschl AM et al. SeptiFast versus blood culture in clinical routine – A report on 3 years experience. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2017;129(11–12):427–34. DOI: 10.1007/s00508-017-1181-3
13. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T et al. Proposed Modifications to the Duke Criteria for the Diagnosis of Infective Endocarditis. *Clinical Infectious Diseases*. 2000;30(4):633–8. DOI: 10.1086/313753
14. Małek-Elikowska 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. *Przegląd Lekarski*. 2016;73(7):525–9. PMID: 29677426
15. Idelevich EA, Seifert H, Sundqvist M, Scudeller L, Amit S, Balode A et al. Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe – an ESGIBS survey. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(11):1399–407. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.03.024
16. Dubourg G, Lamy B, Ruimy R. Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24(9):935–43. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.03.031
17. Morton B, Nagaraja S, Collins A, Pennington SH, Blakey JD. A Retrospective Evaluation of Critical Care Blood Culture Yield – Do Support Services Contribute to the “Weekend Effect”? *PLOS ONE*. 2015;10(10):e0141361. DOI: 10.1371/journal.pone.0141361
18. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock. 2016. *Intensive Care Medicine*. 2017;43(3):304–77. DOI: 10.1007/s00134-017-4683-6
19. Lamy B, Ferroni A, Henning C, Cattoen C, Laudat P. How to: accreditation of blood cultures’ proceedings. A clinical microbiology approach for adding value to patient care. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24(9):956–63. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.01.011
20. Liesman RM, Pritt BS, Maleszewski JJ, Patel R. Laboratory Diagnosis of Infective Endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017;55(9):2599–608. DOI: 10.1128/JCM.00635-17
21. Gould FK, Denning DW, Elliott TSJ, Foweraker J, Perry JD, Prendergast BD et al. Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(2):269–89. DOI: 10.1093/jac/dkr450
22. Patel R, Vetter EA, Harmsen WS, Schleck CD, Fadel HJ, Cockrell FR. Optimized Pathogen Detection with 30- Compared to 20-Milliliter Blood Culture Draws. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(12):4047–51. DOI: 10.1128/JCM.01314-11
23. Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Yu. Express identification of positive blood cultures using direct MALDI-TOF mass spectrometry. *Anesthesiology and Reanimatology*. 2015;60(5):71–5. [Russian: 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]
24. Sohail MR, Gray AL, Baddour LM, Tleyjeh IM, Virk A. Infective endocarditis due to *Propionibacterium* species. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009;15(4):387–94. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02703.x
25. Petti CA, Bhally HS, Weinstein MP, Joho K, Wakefield T, Reller LB et al. Utility of Extended Blood Culture Incubation for Isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella* Organisms: a Retrospective Multicenter Evaluation. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(1):257–9. DOI: 10.1128/JCM.44.1.257-259.2006
26. Chambers ST, Murdoch D, Morris A, Holland D, Pappas P, Almela M et al. HACEK Infective Endocarditis: Characteristics and Outcomes from a Large, Multi-National Cohort. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63181. DOI: 10.1371/journal.pone.0063181
27. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I 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. *European Heart Journal*. 2009;30(19):2369–413. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp285
28. Lamas CC, Fournier P-E, Zappa M, Brandão TJD, Januário-da-Silva CA, Correia MG et al. Diagnosis of blood culture-negative endocarditis and clinical comparison between blood culture-negative and blood culture-positive cases. *Infection*. 2016;44(4):459–66. DOI: 10.1007/s15010-015-0863-x
29. Houpiakian P, Raoult D. Blood Culture-Negative Endocarditis in a Reference Center: Etiologic Diagnosis of 348 Cases. *Medicine*. 2005;84(3):162–73. DOI: 10.1097/01.md.0000165658.82869.17
30. Geissdorfer W, Moos V, Moter A, Loddenkemper C, Jansen A, Tandler R et al. High Frequency of *Tropheryma whippelii* in Culture-Negative Endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(2):216–22. DOI: 10.1128/JCM.05531-11
31. Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(9):2283–7. DOI: 10.1128/JCM.35.9.2283-2287.1997
32. Cheng J, Hu H, Kang Y, Chen W, Fang W, Wang K et al. Identification of pathogens in culture-negative infective endocarditis cases by metagenomic analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2018;17(1):43. DOI: 10.1186/s12941-018-0294-5
33. Cheng J, Hu H, Fang W, Shi D, Liang C, Sun Y et al. Detection of pathogens from resected heart valves of patients with infective endocarditis by next-generation sequencing. *International Journal of Infectious Diseases*. 2019;83:148–53. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.03.007
34. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G et al. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. 2011;29(1):24–6. DOI: 10.1038/nbt.1754
35. Speranskaya A.S. Sequencing Next Gen. P. 145–171. In: Ageeva M.R., Azarova V.S., Alvares Figeroa M.V., Veselova O.A., Gushin A.E., Dedkov V.G. et al. Molecular diagnostics of infectious diseases. -M.: RИПОЛ classic;2018. - 654 p. [Russian: Сперанская А.С. Секвенирование Next Gen. С. 145–171. В книге: Агеева М.Р., Азарова В.С., Альварес Фигероа М.В., Веселова О.А., Гушин А.Е., Дедков В.Г. и др. Молекулярная диагностика инфекционных болезней. - М.: РИПОЛ классик, 2018. – 658с]. ISBN 978-5-386-12296-6
36. Maneg D, Sponsel J, Müller I, Lohr B, Penders J, Madlener K 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 Research International*. 2016;2016:7923874. DOI: 10.1155/2016/7923874
37. Harris KA, Yam T, Jalili S, Williams OM, Alshafi K, Gouliouris T 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. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2014;33(11):2061–6. DOI: 10.1007/s10096-014-2145-4
38. Strashnikova N.S., Martynova G.P., Salmina A.B., Olovyanikova R.Ya., Kutayakov V.A., Tohidpur A. Possibilities of using proteomic analysis in infectiology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(2):248–61. [Russian: Страшникова Н.С., Мартынова Г.П., Салмина А.Б., Оловяникова Р.Я., Кутяков В.А., Тохидапур А. Возможности применения протеомного анализа в инфектологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(2):248–61]. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-248-261
39. Croxatto A, Prod’hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Mi-*

- crobiology Reviews. 2012;36(2):380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
40. Prod'homme G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(4):1481–3. DOI: 10.1128/JCM.01780-09
41. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM et al. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(6):2110–5. DOI: 10.1128/JCM.02215-09
42. Machen A, Drake T, Wang YF (Wayne). 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
43. Burckhardt I, Zimmermann S. Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(9):3321–4. DOI: 10.1128/JCM.00287-11
44. Hooff GP, van Kampen JJA, Meesters RJW, van Belkum A, Goessens WHF, Luiders TM. Characterization of β -Lactamase Enzyme Activity in Bacterial Lysates using MALDI-Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*. 2012;11(1):79–84. DOI: 10.1021/pr200858r
45. Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *PROTEOMICS – Clinical Applications*. 2013;7(11–12):767–78. DOI: 10.1002/prca.201300042
46. Rumbeshit V.V., Matsionis A.E., Dyuzhikov A.A., Sarvilina I.V. Immunoproteomics of infective endocarditis of native heart valves. *Medical Immunology*. 2008;10(1):27–34. [Russian: Румбешит В.В., Мационис А.Э., Дюжиков А.А., Сарвилина И.В. Иммунопротеомика инфекционного эндокардита нативных клапанов сердца. *Медицинская иммунология*. 2008;10(1):27–34]
47. Osipov G.A., Zybina N.N., Rodionov G.G. Experience of Using Mass Spectrometry of Microbial Markers in Laboratory Diagnostics. *Medical Alphabet*. 2013;1(3):64–7. [Russian: Осипов Г.А., Зыбина Н.Н., Родионов Г.Г. Опыт применения масс-спектрометрии микробных маркеров в лабораторной диагностике. *Медицинский алфавит*. 2013;1(3):64–7]
48. Brinkman CL, Vergidis P, Uhl JR, Pritt BS, Cockerill FR, Steckelberg JM et al. PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(7):2040–6. DOI: 10.1128/JCM.00304-13
49. Wallet F, Herwegh S, Decoene C, Courcol RJ. PCR-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry: a new tool for the diagnosis of infective endocarditis from heart valves. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;76(2):125–8. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.007
50. Lepidi H, Houpihan P, Liang Z, Raoult D. Cardiac Valves in Patients with Q Fever Endocarditis: Microbiological, Molecular, and Histologic Studies. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003;187(7):1097–106. DOI: 10.1086/368219
51. Morris AJ, Drinkovic D, Pottumarthy S, Strickett MG, MacCulloch D, Lambie N et al. Gram stain, culture, and histopathological examination findings for heart valves removed because of infective endocarditis. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(6):697–704. DOI: 10.1086/367842
52. Munoz P, Bouza E, Marin M, Alcala L, Rodriguez Creixems M, Valerio M et al. Heart Valves Should Not Be Routinely Cultured. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(9):2897–901. DOI: 10.1128/JCM.02173-07